

AUS DER ABTEILUNG FÜR MOLEKULARE PATHOLOGIE  
FRAU PROF. DR. RER. NAT. ANJA-KATRIN BOßERHOFF  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

ANALYSE DER DIFFERENTIELLEN GENEXPRESSION IM MALIGNEN MELANOM  
AUF DER BASIS VON cDNA-ARRAY UNTERSUCHUNGEN

*(ANALYSIS OF DIFFERENTIAL GENE EXPRESSION IN THE MALIGNANT MELANOMA  
BASED ON cDNA-ARRAY STUDIES)*

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Markus Vogtmann

2012



AUS DER ABTEILUNG FÜR MOLEKULARE PATHOLOGIE  
FRAU PROF. DR. RER. NAT. ANJA-KATRIN BOßERHOFF  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

ANALYSE DER DIFFERENTIELLEN GENEXPRESSION IM MALIGNEN MELANOM  
AUF DER BASIS VON cDNA-ARRAY UNTERSUCHUNGEN

*(ANALYSIS OF DIFFERENTIAL GENE EXPRESSION IN THE MALIGNANT MELANOMA  
BASED ON cDNA-ARRAY STUDIES)*

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Markus Vogtmann

2012

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Anja-Katrin Boßerhoff

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Sigrid Karrer

Tag der mündlichen Prüfung: 20.03.2013

## Inhaltsverzeichnis:

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Zusammenfassung .....</b>   | <b>7</b>  |
| <b>Abstract .....</b>  | <b>9</b>  |
| <b>1 Einleitung.....</b>   | <b>11</b> |
| 1.1 Der Aufbau der Haut .....  | 11        |
| 1.1.1 Die Epidermis .....  | 11        |
| 1.1.2 Die Dermis.....  | 12        |
| 1.1.3 Die Subkutis .....   | 13        |
| 1.2 Die Melanozyten .....  | 13        |
| 1.2.1 Herkunft und Differenzierung.....  | 14        |
| 1.2.2 Entstehung und Funktionen der Melanosomen .....                              | 14        |
| 1.2.3 Die Melanogenese .....   | 15        |
| 1.2.4 Die Photobiologie des Melanins .....   | 16        |
| 1.2.5 Die Regulationsmechanismen der Melanogenese .....                            | 17        |
| 1.3 Die Genetik des malignen Melanoms .....  | 18        |
| 1.3.1 Klassifikationssysteme .....   | 19        |
| 1.3.2 Keimbahnmutationen .....   | 20        |
| 1.3.3 Somatische Mutationen.....   | 23        |
| <b>2 Material und Methoden .....</b>   | <b>26</b> |
| 2.1 Die Datenbank-Analyse .....  | 26        |
| 2.2 Labormaterialien .....   | 29        |
| 2.2.1 Allgemeine Materialien.....  | 29        |
| 2.2.2 Geräte .....   | 29        |
| 2.2.3 Oligonukleotide.....   | 30        |
| 2.2.4 Säugerzelllinien .....   | 30        |
| 2.2.5 Software.....  | 31        |
| 2.3 Methoden.....  | 31        |
| 2.3.1 Kultivierung von Melanomzelllinien und normalen humanen Melanozyten.....     | 31        |
| 2.3.2 RNA-Isolierung aus Säugerkzellen .....                                       | 31        |
| 2.3.3 Reverse Transkription .....  | 32        |
| 2.3.4 Quantitative <i>real time</i> PCR .....                                      | 32        |
| <b>3 Ergebnisse .....</b>  | <b>34</b> |
| 3.1 Ergebnisse der Datenbank-Analyse.....  | 34        |
| 3.2 Ergebnisse der quantitativen <i>real time</i> PCR.....                         | 57        |
| <b>4 Diskussion.....</b>   | <b>64</b> |
| 4.1 FHOD3 - <i>formin homology 2 domain containing 3, FHOS2, formactin 2</i> ..... | 64        |
| 4.1.1 Die Familie der <i>formin homology</i> Proteine.....                         | 64        |
| 4.1.2 Spezifische Eigenheiten von FHOD3 .....                                      | 65        |
| 4.1.3 FHOD3 in der Tumor- und Melanomentstehung.....                               | 65        |
| 4.2 TNFRSF21 - <i>tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21</i> .....  | 68        |
| 4.2.1 Die Apoptose als Hauptaufgabe von TNFRSF21 .....                             | 68        |
| 4.2.2 TNFRSF21 in der Tumor- und Melanomentstehung.....                            | 69        |
| 4.2.3 Klinische Bedeutungen der Veränderungen von TNFRSF21.....                    | 71        |
| 4.3 HEY1 - <i>hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1</i> .....          | 72        |
| 4.3.1 HEY1, Effektorprotein des <i>Notch-pathway</i> .....                         | 72        |

|   |           |
|---|-----------|
| 4.3.2 HEY1 in der Tumor- und Melanomentstehung.....                                       | 73        |
| 4.4 Die <i>affymetrix arrays</i> als Ausgangspunkt experimenteller Grundlagenforschung?.. | 77        |
| 4.4.1 Gemeinsamkeiten und Unterschiede in den Ergebnissen.....                            | 77        |
| 4.4.2 Mögliche Ursachen der Unterschiede .....  | 82        |
| <b>5 Literaturverzeichnis .....</b>   | <b>84</b> |
| <b>6 Danksagung .....</b>   | <b>91</b> |
| <b>Erklärung zum Promotionsverfahren .....</b>  | <b>92</b> |

## Zusammenfassung

Das maligne Melanom ist eine der bösartigsten Tumorerkrankungen des Menschen, deren Inzidenz in den letzten Jahren zunehmend ansteigt. Die Zellen, die dabei maligne entarten, sind die Pigmentzellen des Menschen, die Melanozyten. Im Laufe ihrer äußerst raschen malignen Progression verlieren sie immer mehr ihre ursprünglichen zellulären Eigenschaften. Ursächlich daran beteiligt sind unter anderem Veränderungen und Mutationen im Bereich der DNA sowie Fehlregulierungen von Stoffwechsel- und Signaltransduktionskaskaden innerhalb der Zellen. Im Zuge dessen ändert sich auch die Expression verschiedenster Gene. Dabei kommt es sowohl zur verstärkten als auch zur verminderten Expression im Vergleich zu den benignen Melanozyten. In den letzten Jahren wurde diese Änderung der Genexpression mithilfe von *affymetrix arrays* anhand eines Großteils der menschlichen Gene unter verschiedenen Fragestellungen untersucht. Diese Daten sind in der Online-Datenbank des NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) frei zugänglich.

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, neue Zielgene zu identifizieren, die in der Entwicklung des malignen Melanoms eine entscheidende Rolle spielen. Gleichzeitig sollte die Frage beantwortet werden, ob die Online-Datenbank des NCBI als Ausgangspunkt für die Suche nach solchen Genen dienen könne. Dazu wurde ein aufwändiger und mehrstufiger Auswahlprozess entwickelt, im Zuge dessen mehrere Tausend Gene untersucht wurden. Für jedes Gen wurden die Ergebnisse von bis zu sieben *affymetrix arrays* analysiert, und auf diese Weise die Auswahl der Gene immer weiter gefiltert. Die Endauswahl der Gene bestand schließlich aus 60 Genen (36 „überexprimierte“ und 24 „unterexprimierte“), die durch den Auswahlprozess als überaus interessant hinsichtlich ihrer Rolle als potenzielles Zielgen bewertet wurden. Als Kandidatengene für die experimentellen Untersuchungen wurden daraus FHOD3 (*formin homology 2 domain containing 3*), FHOS2, *formactin 2*), TNFRSF21 (*tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21*), HEY1 (*hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1*) und COBL (*Cordon bleu homologue (mouse)*) ausgewählt. Die *arrays* zeigten eine signifikant erhöhte Expression im malignen Melanom im Vergleich zu Melanozyten für FHOD3, TNFRSF21 und HEY1. Für COBL dagegen zeigten die Daten eine signifikant verminderte Expression im Melanom im Vergleich zu Melanozyten.

Daraufhin folgte die experimentelle Untersuchung dieser Gene mit Hilfe der quantitativen *real time* PCR Technik. Die zu quantifizierende mRNA wurde dabei aus NHEMs (*normal human epidermal melanocytes*) und primären (Mel Ei, Mel Wei, Mel Ho und Mel Juso) sowie metastasierten (Mel Im, Mel Ju, Sk-mel 3, Sk-mel 28, HTZ19d, MV3, HMB2 und 501 Mel) Melanomzelllinien gewonnen. Die Ergebnisse zeigten für FHOD3 keine signifikanten Veränderungen im Laufe der malignen Progression. Für TNFRSF21 konnte ein signifikanter Anstieg der Expression in primären Tumorzellen im Vergleich zu Melanozyten nachgewiesen werden. Auch der Anstieg der Expression in metastasierten Melanomzellen im Vergleich zu Melanozyten und primären Tumorzellen war signifikant. Bei HEY1 zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Anstieg der Expression in den primären Melanomzellen im Vergleich zu den Melanozyten. Bei den metastasierten Tumorzelllinien ergab sich der Hinweis auf mindestens zwei verschiedene Subpopulationen. Die größere (bestehend aus Mel Im, Mel Ju, HTZ19d, HMB2 und 501 Mel) zeigte eine signifikante Steigerung der Expression im Vergleich zu den Melanozyten und den primären Tumorzellen. Für COBL konnte die quantitative *real time* PCR nicht durchgeführt werden, da sich für das Gen kein geeignetes Primerpaar etablieren ließ.

Auf diese Art und Weise konnten daher mit TNFRSF21 und HEY1 zwei neue Zielgene für das maligne Melanom identifiziert werden, deren weitere Analyse interessante Einblicke in das Tumorgeschehen verspricht. Außerdem wird es wissenswert sein zu beobachten, ob sich in der Zukunft eine tumorfördernde oder –hemmende Funktion für diese beiden Proteine herausstellen wird. Hinsichtlich ihrer Funktion in benignen Zellen und der Beobachtungen in anderen Tumorprozessen erscheinen beide Alternativen als möglich.

Die Frage, ob die Online-Datenbank des NCBI als Ausgangspunkt für die Suche nach Zielgenen allgemein geeignet ist, kann im Rahmen dieser Arbeit positiv beantwortet werden. Dafür spricht einerseits, dass bei zwei der drei experimentell untersuchten Gene die ermittelten Werte und Daten den Erwartungen entsprachen und die Ergebnisse der *arrays* widerspiegeln. Darüber hinaus konnten auch für einen Großteil der restlichen Gene der Endauswahl gleichlautende Assoziationen mit dem malignen Melanom oder anderen Tumorgeschehen in aktuellen wissenschaftlichen Publikationen gefunden werden.



## Abstract

The malignant melanoma is one of the most malignant tumorous diseases known to mankind. Its incidence is rising steadily over the last years. The cells, which degenerate malignantly, are the human pigment cells, the melanocytes. During their extremely fast malignant progression, they constantly continue to lose their original cellular qualities. This progression is in parts caused by DNA changes and mutations as well as by irregular adjustments of cascades, both in metabolism and signal transduction, inside the cells. In the course of this, also changes in the gene expression occur. This can result in a higher or lower expression level of genes compared with the genetic profile of the benign melanocytes. Over the last years these changes in gene expression have been examined with affymetrix arrays for the majority of the human genome. The data of these studies is accessible on the online data bank of the NCBI (National Center for Biotechnology Information).

The goal of this dissertation was to identify new target genes which play an essential role in the development of the malignant melanoma. At the same time we wanted to answer the question if the online data bank of the NCBI could be used as a basis for the search after these genes. For that purpose a complex selection process was developed in which course several thousands of genes were analyzed. For every gene the results of up to seven affymetrix arrays were examined, thus more and more filtering the selection of the genes. The final selection contained 60 genes (36 with a higher and 24 with a lower gene expression level compared to the melanocytes). All of these genes were rated as very interesting candidates in terms of their role as a potential target gene. For the experimental procedures FHOD3 (formin homology 2 domain containing 3, FHOS2, formactin 2), TNFRSF21 (tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21), HEY1 (hair/enhancer-of-split related with YRPW motif 1) and COBL (Cordon bleu homologue (mouse)) were chosen. The affymetrix arrays showed a significantly elevated gene expression level in the malignant melanoma for FHOD3, TNFRSF21 and HEY1. For COBL the data showed a significantly reduced gene expression level in the melanoma compared to the melanocytes.

The next step was the experimental analysis of these genes using quantitative real time PCR technology. The mRNA was extracted from NHEM (normal human epidermal melanocytes) as well as primary (Mel Ei, Mel Wei, Mel Ho and Mel Juso) and metastasized (Mel Im, Mel Ju, Sk-mel 3, Sk-mel 28, HTZ19d, MV3, HMB2 and 501 Mel) melanoma cell lines. The results for FHOD3 did not show any significant changes in the gene expression level during the malignant progression. TNFRSF21 showed a significant gene expression increase in the primary melanoma cells compared to the level of the melanocytes and another significant increase in the metastasized cells compared to both the levels of the melanocytes and the primary melanoma cells. HEY1 also showed a significant gene expression increase in the primary melanoma cells compared to the level of the melanocytes. Concerning the gene expression of HEY1 in the metastasized melanoma cell lines, a closer analysis of the results suggested the existence of two different subpopulations. The bigger one (Mel Im, Mel Ju, HTZ19d, HMB2 and 501 Mel) showed a significant gene expression increase compared to both the levels of the melanocytes and the primary melanoma cells. COBL could not be analyzed by quantitative real time PCR technology because it was not possible to establish a primer for this gene.

According to these analyses TNFRSF21 and HEY1 were identified as new target genes for the malignant melanoma. Future investigations of these genes promise interesting new insights in the tumor process. Furthermore it will be knowledgeable to find out, whether a tumor suppressor or an oncogene function will be determined for these two genes. According to their known functions in benign cells and observations in other tumor processes, both alternatives seem to be possible.

The question, if the online data bank of the NCBI is usable as a basis for the search after target genes in general, can be answered positively according to our data. Two of the three genes that were analyzed experimentally showed the expected results and also reflected the results of the arrays. Moreover, for a bigger part of the remaining genes included in the final selection, we found conformous associations with the malignant melanoma or other tumor processes in current scientific publications.

# 1 Einleitung

## 1.1 Der Aufbau der Haut

Die Haut ist das größte Organ des Menschen und übt als unverzichtbare Kontaktfläche, aber auch Barriere zur Umwelt, eine Vielzahl verschiedenster wichtiger Funktionen aus. Sie kann nicht als einheitlicher Zellverband gesehen, sondern muss als heterogener Zusammenschluss unterschiedlicher Zellarten und –gruppierungen verstanden werden. Die Haut ist grundsätzlich in zwei verschiedene Schichten unterteilt, die Epidermis und die Dermis (Welsch, 2006).

### 1.1.1 Die Epidermis

Die Epidermis (Oberhaut) als äußerste Zone stellt eine epitheliale Zellschicht vom Typ eines mehrschichtig verhornenden Plattenepithels dar, die sich im Laufe der Zeit stetig erneuert und regeneriert. Die Epithelzellen der Epidermis werden als Keratinozyten bezeichnet, da der Großteil des Zellvolumens durch das Filamentprotein Keratin gestellt wird. Zur Mitose fähige Basalzellen am Grund der Epidermis sind bis ins hohe Alter fähig sich zu vermehren und Defekte wieder aufzufüllen. Durch fortschreitende Differenzierung werden diese Zellen zu Korneozyten. Die Verknüpfung der Keratinozyten untereinander erfolgt vorwiegend über interzelluläre Verbindungen vom Typ der Desmosomen. In der Epidermis besteht eine gleichmäßige Schichtung, aufgeteilt in eine Stratum basale, ein Stratum spinosum, ein Stratum granulosum, ein Stratum lucidum (nur im Bereich der Leistenhaut) und ein Stratum corneum (Welsch, 2006). Alle diese Schichten werden von den Keratinozyten nacheinander durchlaufen, wobei die Zellen weiter und weiter nach oben wandern. Das Stratum basale stellt einen einschichtigen Zellsaum dar, der der kutanen Basalmembran direkt aufsitzt und dem Verlauf der dermalen Papillen folgt. Das Stratum spinosum („Stachelzellenschicht“) verdankt seinen Namen dem falten- und fortsätzereichen Aussehen der Keratinozyten in diesem Bereich. Die Zellzwischenräume sind hier noch sehr weit und wasserreich. Da sich auch im Stratum spinosum noch vereinzelt Mitosefiguren finden lassen, werden das Stratum basale und das Stratum spinosum oft zum Stratum germinativum („Keimschicht“) zusammengefasst. Das Stratum granulosum stellt die Grenze zum verhornenden Bereich der Oberhaut dar. Die Keratinozyten beginnen in diesem Stadium mit der Synthese und Ausschleusung

lipidhaltiger extrazellulärer Matrix in Form von Lamellenkörpern (Welsch, 2006), was zu einer wasserabweisenden Abdichtung der Interzellulärspalten in der Epidermis führt. Diese Lipide schützen den Körper vor Austrocknung. Den Namen erhält diese Schicht durch die lichtmikroskopisch sichtbaren Granula im Cytoplasma der Keratinozyten. Das Stratum lucidum ist eine eosinophile Übergangsschicht, die man nur in der Leistenhaut, also der Haut von Hand- und Fußflächen findet. In der Felderhaut, den übrigen Hautabschnitten, kommt sie nicht vor. Dieser Abschnitt, der den Übergang zwischen den tieferen Schichten lebender Zellen und toter völlig verhornter Zellen markiert, ist jedoch auch in der Leistenhaut unterschiedlich stark ausgeprägt. Hier findet der Vorgang des geplanten Zelltodes, der Apoptose, statt (Welsch, 2006). Die nurmehr toten Zellhüllen ohne Kern und Stoffwechselaktivität, die nun zu ca. 80% aus Keratin bestehen, bilden das Stratum corneum. Es stellt als starker, durch die extrazelluläre Matrix (Glykosaminoglykane, Proteoglykane, Zytokeratine) verfestigter, Verbund die äußere wasserabweisende Hornschicht dar. Auch die desmosomalen Zellkontakte sind in dieser Schicht noch immer intakt und sorgen für zusätzlichen Halt. Das Stratum corneum verleiht der Haut so den notwendigen Schutz vor Austrocknung und mechanische Stabilität. Mit der Zeit werden die Zellhüllen als Hornschuppen abgestoßen und wieder durch von unten nachwachsende und –drängende Zellen ersetzt. Die komplette Durchwanderung der einzelnen Schichten, und die damit verbundene Zelldifferenzierung, der Keratinozyten dauert ca. 4 Wochen und wird durch verschiedene hormonelle Faktoren stimuliert und reguliert (Welsch, 2006).

In der Epidermis finden wir weitere Zellpopulationen, die, wenn auch zahlenmäßig weitaus geringer vorhanden, ebenso wichtige Funktionen ausüben. Zuvorderst sind hier die Melanozyten zu nennen, die im weiteren noch ausgiebiger besprochen werden; weiterhin Langerhans-Zellen, Merkelzellen und vereinzelte, vorwiegend CD8-positive Lymphozyten (Welsch, 2006).

### 1.1.2 Die Dermis

Die Dermis (Lederhaut) besteht im Gegensatz zur Epidermis vorwiegend aus Bündeln kollagener und Netzwerken elastischer Fasern und kann als Bindegewebe der menschlichen Haut betrachtet werden. Zwischen den Fasern liegen verstreute, aber über

lange Fortsätze in Verbindung stehende, Fibroblasten. Sie sind für die Produktion der Fasern verantwortlich (Braun-Falco et al., 2005). Die Dermis lässt sich in ein Stratum papillare mit lockerer sowie ein darunter liegendes Stratum reticulare mit deutlich festerer Gewebsstruktur einteilen. Über die ganze Dermis verteilt finden wir wieder verschiedene Zellen des Immunsystems wie Lymphozyten, Mastzellen und Makrophagen. Außerdem liegen in der Dermis die Meissner-Tastkörperchen (Welsch, 2006).

### 1.1.3 Die Subkutis

Unter der Dermis liegt die Subkutis, die nach der anatomischen Nomenklatur eigentlich nicht mehr zur eigentlichen Haut oder Kutis gehört. Offiziell wird die Subkutis daher auch Hypodermis oder Unterhaut genannt, die dann mit den beiden darüberliegenden Schichten als Gesamtorgan das Integumentum commune bildet. Die Subkutis besteht vorwiegend aus Fettgewebe, welches durch dünne Bindegewebssepten unterteilt wird. Das Fettgewebe der Subkutis dient dem Menschen als thermale Isolationsschicht und als Depotfett. An bestimmten Stellen jedoch, wie z.B. den Fußsohlen, kommen ihm auch strukturelle Funktionen als Baufett zu (Welsch, 2006).

## 1.2 Die Melanozyten

Melanozyten sind die Pigmentzellen der Haut und bilden in mehreren enzymatischen Schritten das Pigment Melanin, welches der Haut der verschiedenen Ethnien ihren charakteristischen Farbton verleiht. Dabei ist die Anzahl der Melanozyten in der Haut bei jedem Menschen ungefähr gleich, denn sie beträgt etwa 1% der epidermalen Zellen. Der Unterschied in der Hautfarbe kommt lediglich durch die Menge des produzierten Melanins zu Stande (Welsch, 2006). Diese angeborene und aufgrund von zellulären genetischen Programmen entstandene Hautfarbe eines jeden Menschen wird als *constitutive skin color* bezeichnet. Die *constitutive skin color* kann jedoch durch Strahlung im ultravioletten Bereich verändert werden, was dann *facultative skin color* genannt wird. Diese Veränderungen sind jedoch temporär und reversibel und stets vom Vorhandensein der jeweiligen Strahlenquelle abhängig (Nordlund et al., 2006).

### 1.2.1 Herkunft und Differenzierung

Die Melanozyten bilden eine eigenständige Zellpopulation, die der embryonalen Neuralleiste entstammt und sich über das Stadium der Melanoblasten zu Melanozyten differenzieren. Sie lagern sich der basalen Schicht der Epidermis an, liegen also direkt der Basallamina auf, bilden jedoch keinerlei desmosomale Zellkontakte zueinander oder zu den umliegenden Keratinozyten aus (Welsch, 2006). Der Pfad, den die Vorläuferzellen der Pigmentzellen am Körperstamm verfolgen, wird als dorsolateraler oder lateraler Pfad bezeichnet. Er liegt zwischen den Somiten des jeweiligen Segments und der darüberliegenden Epidermis (Nordlund et al., 2006). Nach dem aktuellen Stand der Forschung ist davon auszugehen, dass die ersten Schritte der weiteren Differenzierungsvorgänge schon innerhalb der Neuralleiste ablaufen. Wichtige Faktoren, die dabei bewiesenermaßen eine Rolle spielen, sind z.B. Wnt1 und Wnt3a (*wingless-related MMTV integration site family, member 1 und 3a*), die Transkriptionsfaktoren Mitf (*microphthalmia-associated transcription factor*), Sox10 (*sex determining region Y-box 10*) und Pax3 (*paired box 3*), oder der von Melanoblasten exprimierte Rezeptor Kit und sein Ligand SLF (*steel factor bzw. stem cell factor*) (Nordlund et al., 2006).

### 1.2.2 Entstehung und Funktionen der Melanosomen

Die Produktion des Hautpigments Melanin findet in den Melanozyten in speziellen Zellorganellen, den Melanosomen, statt. Sie zeigen Verwandtschaftsmerkmale zu den Lysosomen, da auch sie aus dem Golgi-Apparat der Zelle entstehen, einen sauren pH-Wert aufweisen und mehrere ihrer Enzyme saure Hydrolasen sind. Die Entwicklung der Melanosomen erfolgt in vier Stadien: Das Prämelanosom oder Melanosom Stadium I enthält weder Melanin noch eine organisierte innere Matrix, sondern lediglich geringe Mengen an Filamenten ohne fertige Organisation. Im Stadium II ist die Matrix organisiert, Melanin ist noch nicht vorhanden. Stadium III ist gekennzeichnet durch eine stete Produktion von Melanin mit einer fortlaufenden Ausfüllung des Organells durch das Pigment. Im Stadium IV ist das gesamte Melanosom schließlich mit Melanin ausgefüllt und damit vollendet (Nordlund et al., 2006). Auch die Verteilung des Melanins an die Keratinozyten erfolgt in Form von Melanosomen. Über lange schlanke Zellfortsätze (Dendriten) und deren zytoskelettale Bestandteile (Aktinfilamente, Myosin Va,

Melanophilin, Rab27A u.a.) werden die Melanosomen näher zu den benachbarten Keratinozyten transportiert. Von diesen werden sie dann über noch nicht völlig geklärte Mechanismen aufgenommen. Neue Untersuchungen zeigen jedoch, dass von den Dendritenspitzen und –seiten feinste Fortsätze (Filopodien) ausgestülpt werden, in denen die Melanosomen auf- und abwandernd gefilmt werden konnten (Nordlund et al., 2006). Diskutiert werden die Phagozytose dieser Teile der Dendriten durch die Keratinozyten, die Sekretion der Melanosomen durch die Melanozyten mit darauffolgender Phagozytose durch die Keratinozyten oder die Fusion zwischen Dendrit und Keratinozyt unter Bildung eines zytoplasmatischen Kanals (Nordlund et al., 2006). Die wichtigsten bekannten Signalfaktoren, die den Transfer von Melanosomen zu den Keratinozyten stimulieren, sind einerseits die UV-Strahlung des Sonnenlichts, aber auch das körpereigene Hormon MSH (Melanozyten stimulierendes Hormon). Nach der Aufnahme der Melanosomen in die Keratinozyten kommt es zur Verschmelzung mit Lysosomen der Zielzellen und damit zu Umbauprozessen, die zu einem sekundären Lysosom führen. Durch die lysosomalen Degradierungsprozesse wird das Melanin in immer feinere Partikel zersetzt, woraus möglicherweise eine Erhöhung der Effektivität des Schutzes resultiert (Nordlund et al., 2006). Ein Melanozyt versorgt dabei ca. 36 Keratinozyten mit Melanin, was als epidermale Melanineinheit bezeichnet wird (Braun-Falco et al., 2005). Selbstverständlich ist der Farbton der Millionen von epidermalen Einheiten nicht exakt identisch, da auch der Gehalt an Melanin nicht exakt identisch sein kann. Die Sehkraft des menschlichen Auges ist jedoch zu schwach, um diese feinen Unterschiede zu entdecken, weshalb unser Gehirn auf eine komplett homogene Hautfarbe schließt (Nordlund et al., 2006).

### 1.2.3 Die Melanogenese

In den Melanosomen wird das Melanin aus dem Grundbaustein Tyrosin, einer Aminosäure, hergestellt. Dabei wird beim Menschen zwischen dem braun-schwarzen Eumelanin und dem gelb-roten Pheomelanin unterschieden (Nordlund et al., 2006). Das wichtigste Enzym der Melanogenese, die Tyrosinase, katalysiert die ersten beiden geschwindigkeitslimitierenden Reaktionen. Tyrosin wird über die Zwischenstufen 3,4-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA), L-Dopachinon, L-Cyclodopa (Leukodopachrom) und L-Dopachrom zu den Grundbausteinen von Eumelanin umgewandelt. Diese sind 5,6-Dihydroxyindol (DHI) bzw. 5,6-Indolchinon (IQ) und 5,6-Dihydroxyindol-2-Carboxylsäure

(DHICA) bzw. 5,6-Indolchinoncarboxylsäure. Für die Synthese dieser Bausteine sind außerdem die Tyrosinase assoziierten Proteine 1 und 2 wichtig. Außerdem wird über das Verhältnis der Grundbausteine zueinander die Anzahl der in Eumelanin vorhandenen Carboxylgruppen bestimmt. Das ist wichtig für die physikalischen Eigenschaften des Eumelanins hinsichtlich Größe, Chelatierung und Absorptionspotential. Über den Schritt der Semichinone kommt es daraufhin zur spontanen Polymerisierung zu Eumelanin, wobei die Faktoren, die diesen letzten Schritt im Einzelnen beeinflussen, noch kaum charakterisiert sind (Nordlund et al., 2006).

Die Produktion von Pheomelanin beginnt mit den gleichen Schritten, schlägt jedoch ab L-Dopachinon einen anderen Pfad ein. Die genauen Abläufe dieser Produktion sind noch weitgehend unbekannt. Über strukturelle Umwandlungen reagieren die Zwischenprodukte zu Alanyl-hydroxy-Benzothiazin (Benzothiazinylalanin), der Untereinheit des fertigen Pheomelanins (Nordlund et al., 2006). Keratinozyten selbst sind grundsätzlich nicht in der Lage Melanin zu bilden.

#### 1.2.4 Die Photobiologie des Melanins

Die physiologische Aufgabe des Melanins ist es, den Schutz vor den schädlichen UV-Strahlen des Sonnenlichts, also Licht der Wellenlänge von 295-400nm, zu gewährleisten. UV-Strahlung hat dabei sowohl akute wie auch chronische Effekte auf die Haut. Die akuten Effekte sind die Schädigung der DNA, oxidativer Stress, die Induzierung von Mutationen und Immunsuppression, sowie Verbrennungen. Auch die Intensivierung der Hautbräunung (*facultative skin color*) ist eine akute Wirkung der Strahlen. Chronische Auswirkungen sind vorrangig die verschiedenen Hauttumore, deren Entstehung durch die Mutationen bei gleichzeitiger Immunsuppression gefördert wird (Nordlund et al., 2006), und Hautalterung als Resultat der Induktion von Matrix-Metalloproteinasen (Fisher et al., 2002). Die allgemeine Annahme, dass die DNA-schädigende Wirkung der Strahlen durch das Melanin gemindert wird oder auch die Art und Weise wie genau dieser Schutz gewährleistet wird, konnten bisher noch nicht vollends durch wissenschaftliche Forschungen nachvollzogen werden (Nordlund et al., 2006). Die Tatsache, dass die Melanosomen in den Melanozyten, wie auch in den Keratinozyten, gleich einer Schutzkappe über dem Zellkern angeordnet werden (Welsch, 2006), legt diese Annahme



aber sehr nahe. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl Eumelanin als auch dessen Bausteine DHI und DHICA in der Lage sind, UV-Strahlen zu absorbieren und zu streuen. Weitere diskutierte Prozesse der Photoprotektion durch Melanin sind Thermoregulation, sowie das Abfangen reaktiver Sauerstoffmetabolite und Superoxidradikale (Nordlund et al., 2006). Eine aktuell diskutierte These sieht einen völlig anderen Zusammenhang zwischen Melanogenese und UV-induzierter Bräunung. In verschiedenen Untersuchungen konnte keine erhöhte photoprotektive Wirkung der erhöhten Melaninkonzentrationen in der Haut von Menschen mit dunkleren Hauttypen gefunden werden. Jedoch zeigte sich eine stark erhöhte Aktivität der DNA-Reperaturmechanismen bei diesen Personen. Es ist also möglich, dass die dunklere Färbung der Haut verschiedener Individuen als Reaktion auf UV-Strahlung lediglich eine Art Indikator für die gesteigerte Fähigkeit zur DNA-Reperatur bei diesen Menschen darstellt (Nordlund et al., 2006). Für die intensivere Bräunung der Haut nach Sonneneinstrahlung sind dabei zwei verschiedene Prozesse verantwortlich. Der erste, das sogenannte *immediate pigment darkening* (IPD), wird nicht durch eine verstärkte Neuproduktion von Melanin vermittelt, sondern stellt eine Oxidierung des existierenden Melanins, sowie eine Umverteilung dessen dar. Die Melanosomen werden hier von ihrer vormals perinukleären Position in die periphereren Abschnitte der Zellen verlagert. Der zweite Mechanismus, das *delayed tanning* (DT), verläuft unter Einflussnahme auf die Melanogenese selbst und wird daher später besprochen.

#### 1.2.5 Die Regulationsmechanismen der Melanogenese

Der Prozess der Melanogenese wird durch verschiedene hormonelle Faktoren entscheidend beeinflusst. Der am besten charakterisierte Faktor im menschlichen Organismus ist das Melanozyten stimulierende Hormon bzw. Melanocortin (MSH). Neben einer Steigerung der Proliferation von Melanozyten stimuliert MSH auch die Produktion von Melanin. Melanocortin vermittelt über mindestens einen spezifischen G-Proteingekoppelten Rezeptor (MC1R, Melanocortin-1 Rezeptor) eine Aktivierung der Melanogenese. Dies wird sekundär über eine gesteigerte Expression und Produktion von Enzymen der Melanogenese, vorrangig der Tyrosinase, erreicht (Nordlund et al., 2006). Außerdem wird durch die Kopplung von MSH an MC1R ein Produktionswechsel von Pheomelanin zu Eumelanin vollzogen (Ward et al., 2012). Andere menschliche Hormone

wie Melatonin, Melanin-konzentrierendes Hormon oder die verschiedenen Geschlechtshormone konnten mittlerweile ebenfalls mit der Regulation der Produktion von Melanin in Verbindung gebracht werden (Nordlund et al., 2006). Ein weiteres Hormon ist das *agouti signal protein* (ASP). Seine Aufgabe ist die Vermittlung des Produktionswechsels von Eumelanin zu Pheomelanin in Melanozyten. Eine Erhöhung der lokalen Konzentrationen des *agouti signal protein* sorgt für eine Steigerung der Produktion von Pheomelanin und umgekehrt. ASP blockiert dabei den Melanocortin-Rezeptor und stellt damit einen physiologischen Antagonisten von MSH dar (Nordlund et al., 2006). Ein weiterer wichtiger Stimulus für die Melanogenese ist die ultraviolette Strahlung des Sonnenlichts, das *delayed tanning* (DT). UV-Strahlen lösen dabei sowohl eine Steigerung der Proliferation von Melanozyten als auch eine Produktionssteigerung von Melanin aus. Ein Mechanismus dabei ist die UV-induzierte Expression und Synthese von MSH-Rezeptoren sowie der Schlüsselenzyme der Melanogenese (Nordlund et al., 2006).

### **1.3 Die Genetik des malignen Melanoms**

Das maligne Melanom gehört zu den bösartigsten Tumorerkrankungen des Menschen. Außerdem zeigt es in den letzten Jahren die größte Häufigkeitszunahme aller malignen Erkrankungen. Die Gefährlichkeit des Tumors ist dabei weniger in der örtlichen Aggressivität des Wachstums begründet, als vielmehr in der ausgeprägten Neigung zu frühzeitiger lymphogener und/oder hämatogener Aussaat und Metastasenbildung. Maligne Melanome bestehen aus Melanomzellen, eine maligne entartete Variante der Melanozyten (Braun-Falco et al. 2005). Im Frühstadium sind Melanome allein durch die lokale Exzision komplett heilbar. Im metastasierten Stadium jedoch gibt es aktuell kaum Heilungschancen. Die bekanntermaßen äußerst rasche Progression zu diesen invasiven Melanomen legt nahe, dass nur wenige genetische Veränderungen nötig sind, um die Wachstumseigenschaften der Zellen gravierend zu alterieren (Nordlund et al., 2006).

### 1.3.1 Klassifikationssysteme

Es existieren aktuell mehrere Klassifizierungssysteme, nach denen Melanome klinisch eingeteilt werden. Die bedeutendste Einteilung erfolgt in vier verschiedene Subtypen von Melanomen:

1. Das superfiziell spreitende Melanom (SSM), der häufigste Typ (bis 70%), liegt weitestgehend intraepidermal und breitet sich flach aus. Knotige Bereiche lassen sich aber auch nachweisen. Es ist meist im Bereich des Rückens, der Brust und der Extremitäten lokalisiert und tritt oft um das 50. Lebensjahr auf. Die Heilungschancen sind hier bei rechtzeitiger Diagnose verhältnismäßig gut (Braun-Falco et al., 2005).
2. Das primär noduläre Melanom (NM), von knotig nodulärer Struktur ohne flache Anteile, stellt ca 20% aller Melanome. Es wächst in die Breite und Tiefe, ist schwarz bis blauschwarz gefärbt und neigt zu Blutungen. Auch hier ist die bevorzugte Lokalisation der Rumpf und die Extremitäten. Es entsteht häufig ab dem 55. Lebensjahr. Die Prognose ist hier weitaus schlechter, da dieser Subtyp bereits sehr früh ein invasives Wachstum zeigt (Braun-Falco et al., 2005).
3. Das Lentigo-maligna-Melanom (LMM) entsteht auf dem Boden einer chronischen lichtbedingten Hautschädigung, der Lentigo maligna. Daher ist die bevorzugte Lokalisation vor allem das Gesicht, der Hals und die Arme der oftmals deutlich älteren Patienten. Es gehört mit etwa 10% zu den selteneren Vertretern (Braun-Falco et al., 2005).
4. Das akrolentiginöse Melanom (ALM) entwickelt sich an Hand- und Fußflächen, unter den Nägeln und auf Schleimhäuten. Aufgrund der atypischen Lokalisation wird es häufig erst spät entdeckt. Das Wachstumsverhalten ist deutlich aggressiver als beim LMM, mit dem es auf Grund ähnlicher Form mitunter verwechselt wird. Bei dunkelhäutigen Patienten ist dieser Subtyp am häufigsten anzutreffen (Braun-Falco et al., 2005).

Eine weitere Form der Einteilung bezieht sich mehr auf den Entstehungsprozess und die Progression der Läsionen (Clark et al., 1984, Clark, 1991). Man unterscheidet hier folgende Stufen:

1. Der benigne Nävus (*common mole*) ist eine angeborene oder erworbene Neoplasie, die durch die Proliferation normaler Melanozyten entsteht. Histologisch finden sich

Ansammlungen der Melanozyten entlang der Basalmembran. Auch wenn diese Nävi keine obligate Präkanzerose darstellen, steigt die Wahrscheinlichkeit an einem Melanom zu erkranken mit Anzahl und Größe der Nävi.

2. Der dysplastische oder atypische Nävus unterscheidet sich durch Asymmetrie, Polymorphie und eine unkontrollierte intraepidermale Proliferation vom normalen Nävus. Dysplastische Nävi werden zu den obligaten Präkanzerosen gezählt.

3. Das radial wachsende Melanom (*RGP melanoma/radial growth phase melanoma*) wächst bis auf Mikroinvasionen in die Dermis streng intraepidermal. Es stellt das erste maligne Wachstumsstadium dar.

4. Das vertikal wachsende Melanom (*VGP melanoma/vertical growth phase melanoma*) zeigt vorrangig knotige Anteile und liegt mit großen Abschnitten innerhalb der Dermis. Die Zellen wachsen hier stark invasiv und erlangen die Fähigkeit zur Metastasierung.

5. Das metastasierende/metastasierte Melanom hat durch invasives Wachstum Anschluss an Lymph- und Blutgefäße erhalten. Sind diese aufgebrochen, können sich Tumoranteile lösen und mit dem Lymph- bzw. Blutstrom mitgerissen werden. An geeigneter Stelle können die Zellen wieder Kontakt zum umliegenden Gewebe bekommen und einen Tochtertumor bilden. Die Erkrankung ist damit als generalisiert zu betrachten.

Diese verschiedenen Stufen müssen keineswegs alle konsekutiv durchlaufen werden. VGP Melanome können teilweise aus RGP Melanomen entstehen, aber auch direkt aus Nävi oder normaler Haut (Miller et al., 2006). Die beiden Klassifikationssysteme sind nicht vollkommen deckungsgleich. Benigne und dysplastische Nävi kommen in der ersten Einteilung nicht vor, da sie per Definition noch keine Melanome sind und kein invasives Wachstum zeigen. SSM können entweder reine RGP Melanome sein oder Areale mit RGP und VGP Charakteristika enthalten. Noduläre Melanome dagegen sind reine VGP Melanome.

### 1.3.2 Keimbahnmutationen

Der bekannteste und besterforschteste „Hochrisiko“-Gen-Lokus, der im Zusammenhang mit einer familiären Häufung von malignen Melanomen steht, ist CDKN2A (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*) auf dem Chromosom 9p21. Während somatische

Mutationen dieses Gens in verschiedenen sporadischen Tumoren durchaus häufig vorkommen, sind die bekannten Keimbahnmutationen nahezu ausschließlich mit einer erhöhten Suszeptibilität für Melanome assoziiert. Die einzige Ausnahme ist das Pankreaskarzinom. Etwa 40% aller Fälle der sogenannten familiären Melanome zeigen Mutationen von CDKN2A. Mutationen von CDKN2A werden grundsätzlich autosomal dominant weitervererbt. Die damit verbundenen Auswirkungen auf den Phänotyp zeigen eine hohe Penetranz. Der CDKN2A-Lokus kodiert für zwei verschiedene Proteine, die durch alternatives Splicing der vier Exone des Gens entstehen: p16 (auch Ink4A bzw. *inhibitor of kinase 4A* genannt) und p14 (ARF, *alternative reading frame*). Beide Produkte sind wichtige Vertreter der Tumorsuppressoren. Die Hauptaufgabe von p16/Ink4A ist es CDK4, die cyclin abhängige Kinase 4, zu binden. Dadurch verbleibt der zentrale Tumorsuppressor RB (repräsentativ für die Familie der Retinoblastomproteine RB1, RBL1 und RBL2) unphosphoryliert an den Transkriptionsfaktor E2F und ähnliche Proteine gebunden. Dies wiederum verhindert, dass die Zelle von der G<sub>1</sub>- in die S-Phase des Zellzyklus eintreten kann. Zelldifferenzierung, -wachstum und -proliferation werden somit blockiert (Ward et al., 2012).

P14/ARF vermittelt seine Wirkung über einen anderen wichtigen und zentralen Faktor der Tumorsuppression im menschlichen Körper, das p53-Protein. P14/ARF ist in der Lage, mit der Ubiquitin-Ligase HDM2 (*human double minute-2*) zu interagieren, so dass dieses Enzym im Nukleolus verbleibt. Damit wird verhindert, dass HDM2 p53 durch eine Markierung mit Ubiquitin für die Proteolyse im Proteasom markiert und damit p53 herunterreguliert (Ward et al., 2012).

Eine ähnlich hohe Penetranz im Phänotyp zeigen die Veränderungen des Gen-Lokus CDK4 (Chromosom 12q13). Er kodiert für die cyclin abhängige Kinase 4, die von p16/Ink4A inhibiert wird. Dies unterstreicht erneut die Bedeutung des RB-abhängigen Pfads bei der Entstehung familiärer Melanome. Die mutierte Version von CDK4 trägt eine alterierte Bindungsstelle, so dass der Kontakt mit p16/Ink4A nicht mehr zustande kommen kann. Effektiv resultiert diese Mutation in denselben pathophysiologischen Abläufen wie die p16-Mutationen. Der Unterschied ist, dass die p16-insensitive Version von CDK4 eines der seltenen Beispiele für die Keimbahntransmission eines dominanten Onkogens darstellt. Die meisten Genmutationen, die die Suszeptibilität für Krebsentstehung erhöhen, sind

Tumorsuppressorgene. CDK4-Mutationen sind im Vergleich zu CDKN2A weitaus seltener. Sie werden nur bei etwa 2% der familiären Melanome gefunden (Ward et al., 2012).

Eine moderate Penetranz zeigen Alterationen der genetischen Information für MC1R (Melanocortin-1 Rezeptor). Allgemein zeigt das MC1R-Gen eine hohe Variabilität in den verschiedenen Ethnien, was auch mit in den verschiedenen Hauttypen resultiert. Bestimmte Aminosäuresequenzen jedoch, bekannt als MC1R-null Phänotyp, reduzieren die Funktion des Rezeptors drastisch. Das sorgt für höhere Konzentrationen von Pheomelanin in den Zellen und phänotypisch für rotes Haar und sehr helle Haut. Diese Menschen sind besonders sensitiv für UV-Strahlen, da ihnen die Fähigkeit der Hautbräunung weitestgehend fehlt. Dies führt sekundär zu einem deutlich erhöhten Risiko für die Melanomentstehung (Ward et al., 2012).

Im Gegensatz zu den bis hier besprochenen Mutationen sind verschiedene *low-penetrance*-Gene gefunden worden, die ebenfalls die Wahrscheinlichkeit der Entstehung von familiären Melanomen erhöhen können. Dabei lassen sich verschiedene Gruppen unterscheiden. Beispiele für Gene, die in die Pigmentierung und Nävusanzahl involviert sind, sind ASP (*agouti signal protein*), TYR (Tyrosinase), TYRP1 (Tyrosinase assoziiertes Protein 1), OCA2 (*oculocutaneous albinism II*), SLC45A2 (*solute carrier family 45, member 2*), NID1 (*nidogen 1*) und MYO7A (*myosin 7A*) (Ward et al., 2012). Darüber hinaus gibt es mehrere mit dem Immunsystem assoziierte Gene, die für eine erhöhte Suszeptibilität für die Entstehung von Melanomen sorgen. Bekanntermaßen entwickeln Patienten mit malignen Melanomen eine Immunantwort, die gegen das Tumorwachstum gerichtet ist. Meist ist diese jedoch nicht stark genug, um den Progress zu stoppen. Speziell bei immunsupprimierten Menschen wird dies augenscheinlich, da bei ihnen das Risiko für die Entwicklung maligner Melanome und auch die Wachstumsrate deutlich höher ist. Kandidatengene, die mit der Melanomentstehung in Verbindung stehen, sind beispielsweise IL-10 (Interleukin 10), TNF- $\alpha$  (Tumornekrosefaktor  $\alpha$ ), IL-6R (Interleukin 6 Rezeptor), INF $\gamma$  (Interferon  $\gamma$ ) und HLA II (*human leukocyte antigen II*) (Ward et al. 2012). Eine weitere interessante Gruppe sind DNA-Reperaturgene mit den Vertretern XPD (*Xeroderma pigmentosum D*)/ERCC2 (*excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 2*), ERCC1 (*excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1*), XPF (*excision repair cross-complementing*

*rodent repair deficiency, complementation group 4*), MGMT (*O*-6-methylguanine-DNA methyltransferase) und TRF1 (*telomeric repeat binding factor 1*) (Ward et al., 2012).

### 1.3.3 Somatische Mutationen

Bei Betrachtung der somatischen Mutationen in sporadischen Melanomen wird klar, dass es große Überschneidungen mit den Keimbahnmutationen gibt. So ist beispielsweise die Rate an Mutationen im p16/RB-Pfad extrem hoch. Untersuchungen an Melanomzelllinien zeigen, dass p16-Defekte, Überexpression von CDK4 oder Defekte von RB1 nahezu in 100% der Fälle vorkommen (Bartkova et al., 1996). In vivo konnte dies jedoch nicht verifiziert werden.

Ein wichtiger Weg zur Entstehung sporadischer Melanome ist der Ras-Raf-MAPK-Pfad. Ras ist die Bezeichnung einer Familie sogenannter kleiner G-Proteine (HRas, KRas, NRas), die oft an der Weiterleitung extrazellulärer Signale (z.B. Wachstumsfaktoren) im Zellinneren beteiligt sind. Die Ras-Enzyme aktivieren die der Raf-Familie, Serin/Threonin Kinasen (ARaf, BRaf, CRaf). Die Raf-Proteine phosphorylieren MEK1 und MEK2, welche dann die *mitogen-activated protein kinase* (MAPK, MAP2K1, MAP2K2) durch Phosphorylierung aktivieren. Die MAP2K1 und MAP2K2 phosphorylieren im Zytoplasma verschiedene Proteine, was das Überleben der Zelle fördert. Die aktivierten Kinasen können darüber hinaus auch in den Zellkern translozieren und dort Transkriptionsfaktoren aktivieren (c-Fos, Ets, Myc oder Elk-1) (Fecher et al., 2007). Im malignen Melanom ist dieser Signalweg konstitutiv aktiv. Ursächlich sind Mutationen in den Genen der Enzyme, die entlang der verschiedenen Stationen auftreten können. Eine der wichtigsten Mutationen wurde bei BRaf entdeckt (V600 Mutation). Sie findet sich bei ca. 80% der mutierten BRaf-Enzyme und wurde in 42-60% der untersuchten Melanome beschrieben (Dutton-Regester et al., 2012). Diese Mutation bedingt einen Aminosäuretausch von Valin zu Glutamat in der Kinasedomäne und damit ein konstitutiv aktives Enzym. Auch NRas-Mutationen wurden detektiert. Weiterhin können verschiedene Wachstumsfaktoren, die beim Melanom mitunter konstant produziert werden, für eine ständige Aktivierung des Signalwegs sorgen (bFGF, *basic fibroblast growth factor*, HGF, *hepatic growth factor*). Physiologische Inhibitoren der MAPK, wie SPRY2 (*sprouty 2*) und RKIP (*raf-1 kinase inhibitory protein*), werden im Melanom außerdem in verminderter Konzentration nachgewiesen. Dadurch

wird der Signalweg nicht inhibiert und bleibt aktiv (Panka et al. 2006). Schlussendlich resultiert eine Steigerung der Proliferation, Angiogenese, Invasivität und Metastasierung.

Eine andere Kaskade, die zu Zellproliferation und Hemmung der Apoptose führt, ist die Phosphoinositid-Kaskade (PI3K-Signalweg). Über ähnliche Rezeptoren wie beim Ras-Raf-MAPK-Weg kommt es zur Produktion des *second messenger* PIP3 (Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat), welcher das Enzym AKT/Proteinkinase B aktiviert. AKT stellt einen zentralen Inhibitor der Apoptose dar. Ein bei der Melanomentstehung wichtiger Faktor in diesem System ist der Tumorsuppressor PTEN (*phosphatase and tensin homolog*). PTEN wirkt über eine Dephosphorylierung von PIP3. Dadurch wird AKT/Proteinkinase B weniger stark aktiviert und Apoptose wahrscheinlicher. Die Inaktivierung von PTEN im Melanom spiegelt sich in den häufigen Aberrationen auf Chromosom 10 wieder, da sein Gen-Lokus auf 10q23.31 zu finden ist. Auch NRas ist in der Lage, auf diese Kaskade Einfluss zu nehmen. Es wirkt hier als Onkogen über eine Erhöhung der PIP3-Konzentration (Nordlund et al., 2006).

Ein anderes Molekül, dessen Mutationen bei der malignen Progression beteiligt zu sein scheint, ist c-KIT, oder CD117. Dieser, schon bei den Melanoblasten vorhandene, Rezeptor dient in der Embryonalphase der Differenzierung zu reifen Melanozyten, indem er die Wachstums- und Differenzierungssignale ins Zellinnere weiterleitet. Inaktivierende Mutationen sind daher auch mit einem Verlust der Melanozyten und Piebaldismus assoziiert. Die intrazellulären Pfade, die von c-KIT angestoßen werden, beinhalten ebenfalls den MAPK-Weg, außerdem Proteine wie die Phospholipase C, den Transkriptionsfaktor Mitf (*microphthalmia-associated transcription factor*) und SRC (*sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog (avian)*). Aktivierende Mutationen des Rezeptors konnten in aktuellen Studien mitverantwortlich für eine maligne Entartung von Melanozyten gemacht werden. Die mutierten Rezeptoren waren dabei unter hypoxischen Bedingungen, die ein Tumorumfeld simulierten, in der Lage, den Ras-Raf-MAPK-Pfad sowie den PI3K-Weg so zu aktivieren, dass es zu einer Transformation der Zellen sowie zu Proliferation kam (Walia et al., 2012).

Weitere wichtige Veränderungen, wenn auch nicht direkt als Mutation der genetischen Information, zeigen sich im Bereich der Wachstumsfaktoren. Wachstumsfaktoren werden



von allen Zellen zum Überleben benötigt. Im Laufe der malignen Transformation erlangen viele Zellen die Fähigkeit, diese Faktoren selbst zu synthetisieren und sich damit unabhängig von externen Quellen zu machen. Autokrine Wachstumsfaktoren werden von den Zellen selbst produziert und regen die eigene Zellproliferation und Migration an. Bei Melanozyten sind das z.B. bFGF (*basic fibroblast growth factor*), MSH (Melanocortin), IL-6, IL-8, IL-10 (Interleukine 6, 8 und 10) und PDGF (*platelet derived growth factor*). Parakrine Wachstumsfaktoren können die Zellen in der Tumorumgebung stimulieren, was diese Zellen dazu bringen kann ihrerseits den Tumor zu unterstützen. Faktoren sind hier TGF- $\beta$  (*transforming growth factor beta*), VEGF (*vascular endothelial growth factor*) und EGF (*epidermal growth factor*). Beim malignen Melanom ist bFGF als der wichtigste Faktor zu nennen. Ursprünglich sind benigne Melanozyten nicht in der Lage dieses Protein zu synthetisieren, jedoch produzieren die entarteten Melanomzellen den Faktor selbst. Er entfaltet seine Wirkung über membranständige Rezeptor-Thyrosinkinasen (FGF-Rezeptoren 1-4). Beim Melanom resultiert darin eine Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalwege, die zusammen die Differenzierung, die Proliferation, das Wachstum und die Migration des Tumors fördern (Bikfalvi et al., 1997).

Eine andere Gruppe von Molekülen, deren Fehlregulierung die maligne Transformation unterstützen kann, sind die Transkriptionsfaktoren. Transkriptionsfaktoren regulieren die Expression von verschiedenen Genen, welche sekundär wiederum Abläufe wie Proliferation, Wachstum oder Differenzierung der Zellen regulieren. Bei der Melanomentstehung wurden Faktoren wie AP-2 $\alpha$  (*activating enhancer binding protein 2 alpha*), Ets-1, MITF (*microphthalmia-associated transcription factor*), NF $\kappa$ B (*nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells*) sowie die Homeobox-Transkriptionsfaktoren HOX-A11, HOX-A13, HOX-B9, HOX-D12 und HOX-D13 untersucht und als mitverantwortlich identifiziert (Walia et al., 2012).

## 2 Material und Methoden

Das Ziel der Untersuchungen bestand darin, Gene für eine Expressionsanalyse zu finden und diese Analyse durchzuführen. Gesucht wurden Unterschiede in der Genexpression zwischen benignen Melanozyten und malignen Melanomzellen bzw. den Zwischenstufen im Laufe der malignen Progression.

### 2.1 Die Datenbank-Analyse

Als Ausgangspunkt für die Genauswahl diente die Online-Datenbank des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) bzw. darin der Bereich der GEO (*Gene Expression Omnibus*) *Profiles*. In dieser frei zugänglichen Datenbank finden sich zu den meisten der menschlichen Gene verschiedenste Expressionsmusteruntersuchungen, die mit sogenannten *affymetrix arrays* erstellt wurden und in graphischer Form auf der Seite vorliegen.

Tabelle 1 zeigt eine Zusammenstellung der in der Datenbank-Analyse verwendeten *arrays*:

|          |  |
|----------|--|
| GDS 1375 | <p><i>„Expression profiling of primary malignant melanoma, benign skin nevi, and normal skin samples. Results identify potential molecular markers for lymph node staging assays, and provide insight into melanoma tumor genesis.“</i></p> <p>Spezies: Homo Sapiens</p> <p>Plattform: GPL96: [HG-U133A] Affymetrix Human Genome U133A Array</p> <p>Talantov D., Mazumder A., Yu J. X., Briggs T. et al. (2005), <i>“Novel genes associated with malignant melanoma but not benign melanocytic lesions”</i>, Clin Cancer Res 11(20): 7234-42. PMID: 16243793</p> |
| GDS 2081 | <p><i>“Analysis of keratinocytes at various time points up to 48 hours following treatment with the Jun kinase (JNK) inhibitor SP600125. SP600125 is a reversible ATP-competitive inhibitor specific for the three isoforms of JNK. Results identify JNK-regulated genes in epidermal keratinocytes.“</i></p>  |

|          |   |
|----------|---|
|          | <p>Spezies: Homo Sapiens</p> <p>Plattform: GPL8300: [HG_U95Av2] Affymetrix Human Genome U95 Version 2 Array</p> <p>Gazel A., Banno T., Walsh R., Blumenberg M. (2006), <i>"Inhibition of JNK promotes differentiation of epidermal keratinocytes"</i>, J Biol Chem 281(29): 20530-41. PMID: 16648634</p>  |
| GDS 1505 | <p><i>"Comparison of cultured skin substitute (CSS), cultured keratinocytes, cultured fibroblasts, and native skin. CSS contains fibroblasts and keratinocytes and can facilitate wound healing. Results provide insight into physiological and molecular differences between CSS and native skin"</i></p> <p>Spezies: Homo Sapiens</p> <p>Plattform: GPL96: [HG-U133A] Affymetrix Human Genome U133A Array</p> <p>Smiley A. K., Klingenberg J. M., Aronow B. J., Boyce S. T. et al. (2005), <i>"Microarray analysis of gene expression in cultured skin substitutes compared with native human skin"</i>, J Invest Dermatol 125(6): 1286-301. PMID: 16354201</p> |
| GDS 1965 | <p><i>"Expression profiling of normal melanocytes, primary melanoma cells, and metastatic melanoma cells. Results provide insight into changes in advanced melanoma relative to normal melanocytes and reveal new targets that can be used in assessing prognosis, staging, and therapy of melanoma patients."</i></p> <p>Spezies: Homo Sapiens</p> <p>Plattform: GPL96: [HG-U133A] Affymetrix Human Genome U133A Array</p> <p>Hoek K., Rimm D. L., Williams K. R., Zhao H. et al. (2004), <i>"Expression profiling reveals novel pathways in the transformation of melanocytes to melanomas"</i>, Cancer Res 64(15): 5270-82. PMID: 15289333</p>                 |
| GDS 1989 | <p><i>"Analysis of tissue specimens representing benign nevus, atypical nevus, melanoma in situ, vertical growth phase (VGP) melanoma, and metastatic growth phase (MGP) melanoma. Results identify expression signatures that</i></p>  |

|          |  |
|----------|--|
|          | <p><i>distinguish benign and atypical nevi and melanomas in situ from VGPs and MGPs.”</i></p> <p>Spezies: Homo Sapiens</p> <p>Plattform: GPL570: [HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array</p> <p>Smith A. P., Hoek K., Becker D. (2005), <i>“Whole-genome expression profiling of the melanoma progression pathway reveals marked molecular differences between nevi/melanoma in situ and advanced-stage melanomas”</i>, Cancer Biol Ther 2005 (9): 1018-29. PMID: 16251803</p>  |
| GDS 1314 | <p><i>“Expression profiling of MelJUSO, A375, 607B, 518A2, and Skmel 28 malignant melanoma cell lines. Results correlated with regions of chromosomal breakpoints, and indicate an association between chromosomal breakpoints and altered gene expression.”</i></p> <p>Spezies: Homo Sapiens</p> <p>Plattform: GPL96: [HG-U133A] Affymetrix Human Genome U133A Array</p> <p>Okamoto I., Pirker C., Bilban M., Berger W. et al. (2005), <i>“Seven novel and stable translocations associated with oncogenic gene expression in malignant melanoma”</i>, Neoplasia 7(4): 303-11. PMID: 15967107</p> |
| GDS 1761 | <p><i>“Analysis of 60 cell lines (the NCI60) derived from tumors from a variety of tissues and organs. Such cell lines are used extensively as experimental models of neoplastic disease. Results identify variation in gene expression patterns in the cell lines and their relationships to tumors in vivo.”</i></p> <p>Spezies: Homo Sapiens</p> <p>Plattform: GPL1290: NCI cDNA array</p> <p>Ross D. T., Scherf U., Eisen M. B., Perou C. M. et al. (2000), <i>“Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines”</i>, Nat Genet 24(3): 227-35. PMID: 10700174</p>  |

**Tabelle 1:** Verwendete affymetrix arrays des National Center for Biotechnology Information (NCBI)

## **2.2 Labormaterialien**

### **2.2.1 Allgemeine Materialien**

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| Braun, Melsungen              | Aqua ad injectabilia                                     |
| Genaxxon, Stafflangen         | dNTP's Set   |
| Invitrogen, Carlsbad, USA     | SuperScript II Reverse Transkriptase Kit (5x First       |
| Strand                        | Buffer, DTT, Superscript II), 100 bp DNA Ladder          |
| Qiagen                        | RNeasy Mini Kit  |
| Roche Diagnostics, Mannheim   | Taq®-DNA Polymerase, RNase A, LightCycler®               |
|                               | Capillaries, dN <sub>6</sub> Primer, PCR reaction buffer |
| Sigma, St. Louis, USA         | Ethidiumbromid, Bromphenolblau                           |
| TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japan | SYBR® Premix Ex Taq™ (TaKaRa, Perfect Real Time)         |

### **2.2.2 Geräte**

#### **Heiz- und Kühlblöcke**

|                     |   |
|---------------------|---|
| Eppendorf, Hamburg  | Thermomixer 5436, Thermomixer comfort,<br>Thermomixer compact |
| Liebisch, Bielefeld | TR-L 285  |

#### **Thermocycler**

|                             |                |
|-----------------------------|----------------|
| Roche Diagnostics, Mannheim | LightCycler II |
|-----------------------------|----------------|

#### **Zentrifugen**

|                             |                        |
|-----------------------------|------------------------|
| Eppendorf, Hamburg          | MiniSpin Plus          |
| Qualtiron, Espoo, England   | Tischzentrifuge        |
| Roche Diagnostics, Mannheim | LC Carousel Centrifuge |

#### **Sonstige Geräte**

|                   |                    |
|-------------------|--------------------|
| Heidolph, Kelheim | Vortexer REAX 2000 |
|-------------------|--------------------|

### 2.2.3 Oligonukleotide

Die Primer wurden von der Firma Sigma Genesys (Cambridge, England) synthetisiert. Es wurde eine 100µM Stammlösung der Oligonukleotide durch Lösen in H<sub>2</sub>O hergestellt und bei -20° Celsius (C) gelagert.

Tabelle 2 zeigt eine Zusammenstellung der Primer für die quantitative *real time* PCR:

| GEN      | <i>for</i>           | <i>rev</i>            | <b>Annealing temperature</b> |
|----------|----------------------|-----------------------|------------------------------|
| FHOD3    | TGCCCACGAGGGTGCAGAGA | TGCCCACGAGGGTGCAGAGA  | 73,9°C/73,5°C                |
| TNFRSF21 | CGGGCTCCCTTCTCTGCTTG | ACGCGCAGGCTTGTGTTGGT  | 73,1°C/72,3°C                |
| HEY1     | GGCAGGAGGGAAAGGTACT  | CTGGGAAGCGTAGTTGTTGAG | 63,2°C /63,6°C               |
| COBL     | TGCAGCCTGAGGAAGGTGGC | GAGGGTGCCCGTGCTGAACC  | 72,2°C/73,4°C                |
|          | AGAACAGGAAGAGCACGA   | GAGTCCAGAGAGACGATGT   | 58,6/ 56,6°C                 |

**Tabelle 2:** Verwendete Primer/Oligonukleotide der quantitative Real-time PCR und zugehörige *annealing*-Temperaturen (für COBL wurden mehrere Versuche unternommen, ein geeignetes Primer-Paar zu etablieren)

### 2.2.4 Säugerzelllinien

|                      |  |
|----------------------|--|
| 501 Mel              | Humane Melanomzelllinie  |
| HMB2                 | Humane Melanomzelllinie aus Metastasen eines Melanoms                                      |
| HTZ 19d              | Humane Melanomzelllinie aus Hirnmetastase eines Melanoms                                   |
| Mel Ei               | Humane Melanomzelllinie aus Primärtumor  |
| Mel Ho               | Humane Melanomzelllinie aus Primärtumor<br>(DSMZ Nr.: ACC62)                               |
| Mel Im               | Humane Melanomzelllinie aus Metastasen eines Melanoms                                      |
| Mel Ju               | Humane Melanomzelllinie aus Metastasen eines Melanoms                                      |
| Mel Juso             | Humane Melanomzelllinie aus Primärtumor<br>(DSMZ Nr.: ACC74)                               |
| Mel Wei              | Humane Melanomzelllinie aus Primärtumor  |
| Melanozyten (NHEM's) | Humane primäre Melanozyten aus normaler Haut ( <i>normal human epidermal melanocytes</i> ) |
| MV3                  | Humane Melanomzelllinie  |

|           |  |
|-----------|--|
| Sk-Mel 3  | Humane Melanomzelllinie aus Lymphknotenmetastase eines Melanoms (ATCC Nr.: HTB-69) |
| Sk-Mel 28 | Humane Melanomzelllinie aus Hautmetastase eines Melanoms (ATCC Nr.: HTB-72)        |

### 2.2.5 Software

|                             |  |
|-----------------------------|--|
| GraphPad Software, USA      | Graph Pad Prism 4 <sup>®</sup> , Graph Pad Prism 6 <sup>®</sup>                    |
| Microsoft, USA              | Microsoft Office Word 2007 <sup>®</sup> , Microsoft Office Excel 2007 <sup>®</sup> |
| Roche Diagnostics, Mannheim | Light Cycler II Software <sup>®</sup>  |

## 2.3 Methoden

### 2.3.1 Kultivierung von Melanomzelllinien und normalen humanen Melanozyten

Die oben genannten Melanomzellen wurden in DMEM mit 10% FKS und 1% Penicillin/Streptomycin bei einer Temperatur von 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Zum Passagieren wurden die Zellen erst mit PBS gewaschen, daraufhin mit 0,05% Trypsin/0,02% EDTA inkubiert und dadurch von der Zellkulturflasche abgelöst. Anschließend wurden die Zellen in DMEM aufgenommen und bei 1200 rpm 4 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in DMEM wieder in Lösung gebracht und 1:5 bis 1:10 verdünnt in neue Zellkulturflaschen verteilt. Jeden zweiten Tag wurde das Zellkulturmedium gewechselt.

Die primären Melanozyten wurden in Melanozytenmedium (PromoCell, Heidelberg) kultiviert. Die Passagierung erfolgte wie bei den Melanomzelllinien nach obigem Schema. Die genannten Vorgänge und Arbeiten zur Kultivierung von Melanomzelllinien und normalen humanen Melanozyten wurden jedoch nicht von mir selbst, sondern von anderen Personen des Laborteams vorgenommen.

### 2.3.2 RNA-Isolierung aus Säugerzellen

Die Isolation von RNA erfolgte mit dem E.Z.N.A.<sup>®</sup> Total RNA Kit I der Firma Omega Bio-tek (VWR, Darmstadt). Die RNA-Isolation erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die in

40µl ddH<sub>2</sub>O eluierte RNA wurde anschließend bei -20°C gelagert. Auch die RNA-Isolierung wurde schon im Vorfeld meiner experimentellen Analysen von anderen Mitarbeitern des Laborteams vorgenommen

### 2.3.3 Reverse Transkription

Als Ausgangssubstrat für die experimentellen Analysen diente RNA verschiedener Zelllinien, sowohl von Melanozyten wie auch Melanomzellen (siehe oben). Pro Reaktionsansatz wurde hiervon 2-5µl eingesetzt. Die Gesamtreaktion wurde in einem 20µl Ansatz durchgeführt:

4µl First Strand Buffer (5x)  
2µl DTT (0,1M)  
1µl dNTPs (10µM)  
1µl dN<sub>6</sub> random-Primer  
2-5µl RNA + H<sub>2</sub>O

Der Ansatz wurde für fünf Minuten bei 70°C erhitzt, um die RNA zu denaturieren und dann auf 50°C abgekühlt. Dann wurde 1µl Superscript hinzugegeben. Der Ablauf der reversen Transkription erfolgte bei 37°C für 60 Minuten. Eine Temperaturerhöhung auf 70°C inaktivierte daraufhin das Enzym und beendete den Vorgang. Durch Zugabe von 1µl RNase A und eine weitere Inkubation für 30 Minuten bei 37°C wurden die restlichen störenden RNA-Reste entfernt. Die erhaltene cDNA wurde bei -20°C zur Konservierung eingefroren, um weitere unerwünschte Reaktionen zu unterbinden.

### 2.3.4 Quantitative *real time* PCR

Zur Quantifizierung der Gen-Expressionsstärke wurde eine quantitative RT-PCR Reaktion durchgeführt. Dazu dienten das LightCycler II System und der SYBR® Premix Ex Taq™ (TaKaRa). Die notwendige Reverse Transkription wurde nach den in 2.3.1 beschriebenen Schritten durchgeführt. Die quantitative RT-PCR erfolgte in einem 20µl Ansatz:



10µl TaKaRa (SYBR® Premix Ex Taq™)  
je 0,5µl der Primer (20µM)  
1µl cDNA + H<sub>2</sub>O

Der Versuchsansatz wurde nun folgendem LightCycler II Programm unterzogen:

|                           |            |   |
|---------------------------|------------|---|
| Denaturierung:            | 1 Zyklus:  | 20°C/s auf 95°C, 30 sec   |
| Amplifikation:            | 40 Zyklen: | 20°C/s auf 95°C, 3 sec  |
|                           |            | 20°C/s auf x°C, 5 sec (x°C: optimierte Temperatur für jedes individuelle Gen und Primerpaar, siehe Tab.2) |
|                           |            | 20°C/s auf 72°C, 16 sec   |
| Analyse der Schmelzkurve: | 1 Zyklus:  | 20°C/s auf 95°C, 15 sec   |
|                           |            | 20°C/s auf 65°C, 15 sec   |
|                           |            | 20°C/s auf 95°C, 15 sec   |
|                           |            | 0,1°C/s auf 40°C  |

Als Standard zur Quantifizierung der Gen-Expressionsstärke wurde ein Haushaltsgen (β-Aktin) mitamplifiziert und –untersucht. Die Quantifizierung der mRNA Expression erfolgte mit der zugehörigen LightCycler II Software nach Angaben des Herstellers.

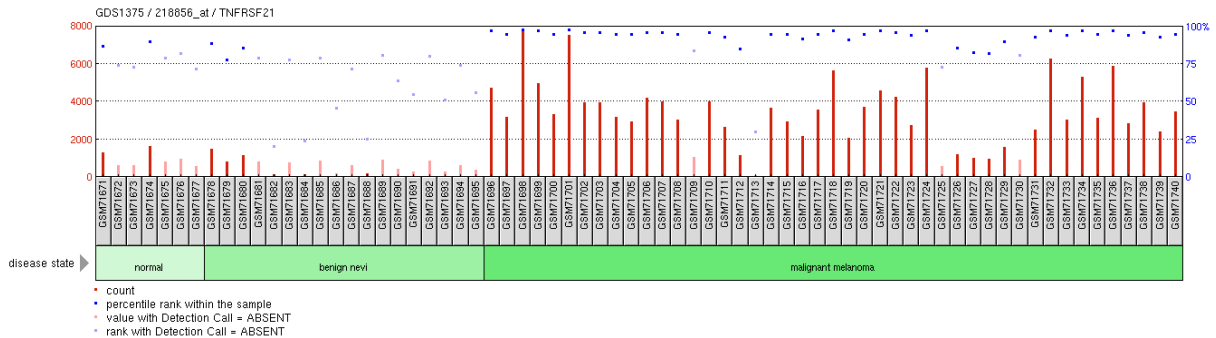
### 3 Ergebnisse

Das Ziel der Arbeit bestand darin, Gene für eine quantitative Messung ihrer Expression auszuwählen und diese Analyse mittels quantitativer *real time* PCR-Technik durchzuführen. Es sollte sich dabei um Gene handeln, die eine Rolle bei der Entstehung des malignen Melanoms zu spielen scheinen. Die Gene wurden zuerst an Hand einer Online-Datenbank ausgesucht. Darauf folgte die experimentelle Untersuchung dieser Gene mit Hilfe der quantitativen *real time* PCR Technik. Untersucht wurden dabei humane Melanozyten und maligne entartete Melanomzellen.

#### 3.1 Ergebnisse der Datenbank-Analyse

Die Online-Datenbank des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) bildet den Ausgangspunkt für die Analysen. Diese Daten können schematisch gesichtet und immer weiter gefiltert werden. Das Ziel ist, Gene zu finden, die für eine erneute und verfeinerte Untersuchung interessant und geeignet sind. Den Startpunkt bildet der *array* GDS1375 (Beispiel Fig. 1). Hier waren Genexpressionsmuster in Zellen normaler Haut mit denen in benignen Nävi und malignen Melanomen verglichen worden. Als interessant für die folgenden experimentellen Untersuchungen gelten einerseits Gene, die in malignen Melanomen im Vergleich zu den benignen Proben eine deutlich gesteigerte Expression zeigen. Sie werden im folgenden als „überexprimiert“ betitelt. Die andere Gruppe besteht aus Genen, deren Expression im Laufe dieses Prozesses gewissermaßen „abgeschaltet“ wird, im folgenden „unterexprimiert“ genannt. So können anhand der Durchschau der Ergebnisse von GDS1375 zwei Gruppen von Genen gebildet werden. Deren Expressionsmuster werden daraufhin anhand weiterer *arrays* erneut analysiert. Wichtig bei der Betrachtung der Graphen der *arrays* ist Folgendes. Für die Expression eines Gens, gerade bei dieser Art der Untersuchung, gibt es keine festgelegte Einheit im Bezug auf die Menge oder Stärke. Die wichtigste Folge daraus ist, dass lediglich innerhalb eines *arrays* die Balkenhöhe gut bei den verschiedenen Genen verglichen werden kann. Bei zwei verschiedenen *arrays* stellt diese Balkenhöhe jedoch keine absolut vergleichbare Maßzahl der Expression dar. Gerade auch deshalb ist eine Zusammenschau aller weiteren *arrays*

ein wichtiger Schritt für eine differenziertere Auswahl der letztendlichen „Kandidatengene“.



**Figure 1:** Beispiel des *affymetrix* array GDS1375 anhand des Gens TNFRSF21. Die Graphik illustriert durch die Höhe der Balken die Stärke der Genexpression in normaler Haut (links), benignen Nävi (Mitte) und malignem Melanom (rechts). Quelle: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/tools/profileGraph.cgi?ID=GDS1375:218856\\_at](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/tools/profileGraph.cgi?ID=GDS1375:218856_at)

Zwei *arrays* (GDS2081 und GDS1505) dienen vorwiegend dazu, Auskunft darüber zu liefern, in wie weit die untersuchten Gene auch in Keratinozyten hergestellt werden. Dies dient auch zur Verfeinerung mancher Ergebnisse aus GDS1375, da hier die lediglich die Expression in „normaler Haut“ untersucht wurde. GDS2081 (Beispiel Fig. 2) diene primär dazu, das Expressionsmuster von Genen unter dem Einfluss eines bestimmten Tyrosinkinaseinhibitors über eine gewisse Zeitspanne (bis zu 48 Stunden) zu testen. Diese spezielle Eigenheit des *arrays* wird auf Grund der fehlenden Relevanz für die eigentliche Fragestellung jedoch weitestgehend außer Acht gelassen. Daher ist bei GDS2081 vorwiegend die linke Hälfte der Abbildung (siehe Fig. 2) interessant. Die untersuchten Zellen sind Keratinozyten. GDS1505 (Beispiel Fig. 3) untersuchte ursprünglich die unterschiedliche Genexpression in vier verschiedenen Zellpopulationen. Getestet wurden Hautproben (*native skin*), Ersatzhautkulturen (*cultured skin substitute*) sowie kultivierte Fibroblasten (*cultured fibroblast*) und Keratinozyten (*cultured keratinocyte*). Interessant bei der aktuellen Analyse ist neben der schon erwähnten Expression der fraglichen Gene in Keratinozyten auch der Vergleich mit den Fibroblasten. Die Ergebnisse beider *arrays* sind folgendermaßen zu interpretieren: Eine hohe Genexpression in Keratinozyten oder Fibroblasten, vor allem im Vergleich zur Hautprobe, spricht dafür, dass in der menschlichen Haut vorwiegend Keratinozyten und Fibroblasten dieses Gen mehrheitlich

exprimieren. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass Melanozyten an dieser Expression in der Haut einen kleineren oder gar keinen Anteil haben. Das Gen ist in diesem Fall also laut GDS2081 und GDS1505 nicht als spezifisch melanozytär reguliert anzusehen und damit weniger interessant für die experimentellen Analysen.

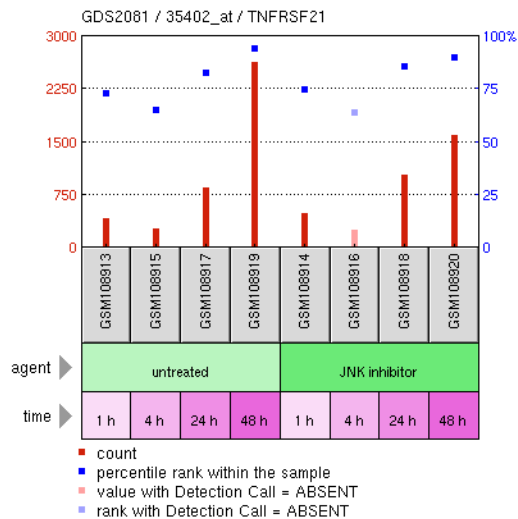


Figure 2: Beispiel des *affymetrix array* GDS2081 anhand des Gens TNFRSF21. Die Graphik illustriert durch die Höhe der Balken die Stärke der Genexpression in unbehandelten (links) und dem Tyrosinkinaseinhibitor ausgesetzten Keratinozyten (rechts) über die Zeit. Quelle: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/tools/profileGraph.cgi?ID=GDS2081:35402\\_at](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/tools/profileGraph.cgi?ID=GDS2081:35402_at)

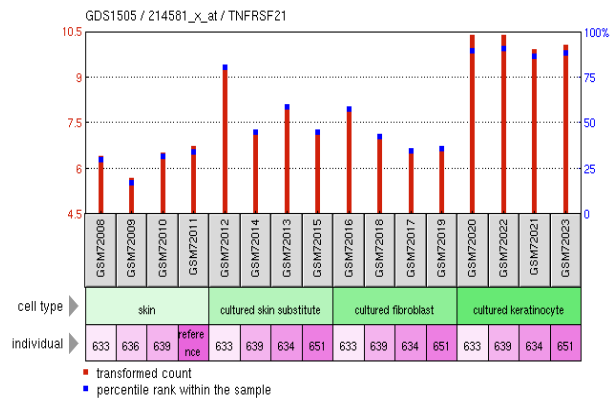


Figure 3: Beispiel des *affymetrix array* GDS1505 anhand des Gens TNFRSF21. Die Graphik illustriert durch die Höhe der Balken die Stärke der Genexpression in Haut (ganz links), Ersatzhautkulturen (Mitte links), kultivierten Fibroblasten (Mitte Rechts) und kultivierten Keratinozyten (ganz rechts). Quelle: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/tools/profileGraph.cgi?ID=GDS1505:214581\\_x\\_at](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/tools/profileGraph.cgi?ID=GDS1505:214581_x_at)

Weitere Arrays zeigen nun spezifischer das Expressionsmuster im Bereich der melanozytären Zellen sowie deren maligner Progression (GDS1965, GDS1989 und GDS1314). GDS1965 (Beispiel Fig. 4) vergleicht die Genexpression in benignen Melanozyten mit der in Zellen maligner Melanome. Bei den Melanomzellen wird darüber hinaus zwischen nicht-metastasierten und metastasierten Vertretern unterschieden. Bei GDS1989 (Beispiel Fig. 6) wurde eine größere Anzahl verschiedener Biopsien und Zelllinien untersucht, und dadurch eine genauere Abstufung erreicht. Untersucht wurden hier kultivierte Zelllinien unterschiedlicher Malignität (epidermale Melanozyten, epidermale Keratinozyten und metastasierte Melanomzellen) sowie bioptisch gewonnene Materialien unterschiedlicher Entartungsstadien (normale Haut, benigner Nävus,

atypischer Nävus, Melanom in situ, *vertical growth phase melanoma*, metastasiertes Melanom, Lymphknotenmetastase eines malignen Melanoms). GDS1314 (Beispiel Fig. 5) ist völlig auf die Expression in Melanomzellen ausgelegt, wobei fünf verschiedene kultivierte Melanomzelllinien untersucht wurden. Es handelt sich hierbei um die Zelllinien Mel Juso, 607B, Sk mel 28, A375 und 518A2. Interessant aus Sicht der aktuellen Untersuchungen ist, dass Mel Juso sowie Sk mel 28 Zelllinien sind, die auch in den später folgenden experimentellen Untersuchungen verwendet wurden. Es muss schon an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass trotz der einheitlichen Bezeichnung dieser Zellen als „Melanomzellen“ die Expressionsmuster von Zelllinie zu Zelllinie extrem variieren können. Dies ist einerseits auf die unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Zellen im Entartungsprozess zurückzuführen ist, jedoch auch auf andere Faktoren wie Kulturbedingungen etc.

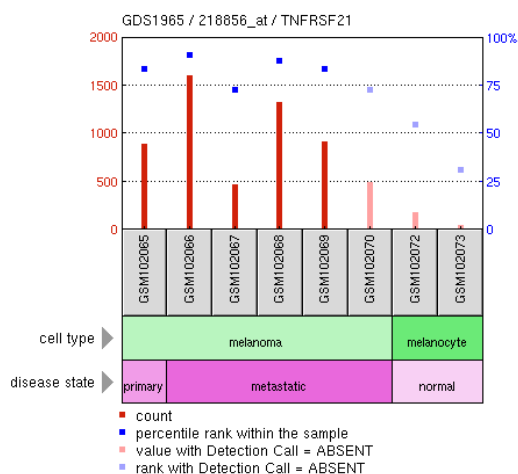


Figure 4: Beispiel des *affymetrix* array GDS1965 anhand des Gens TNFRSF21. Die Graphik illustriert durch die Höhe der Balken die Stärke der Genexpression in Melanomzellen (links, hellgrün) und Melanozyten (rechts, grün). Der Melanombereich wird noch unterteilt in primäre (helllila, ganz links) und metastasierte Tumorzellen (lila, Mitte). Quelle: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/tools/profileGraph.cgi?ID=GDS1965:218856\\_at](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/tools/profileGraph.cgi?ID=GDS1965:218856_at)

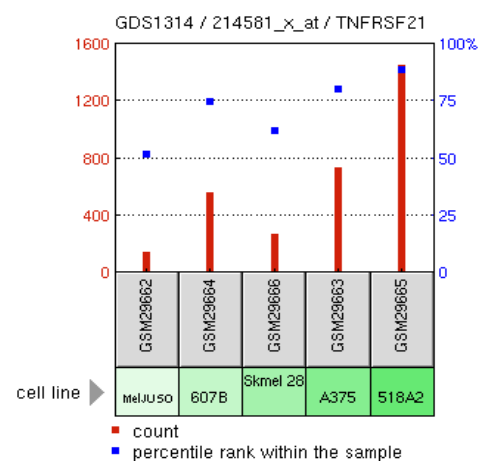
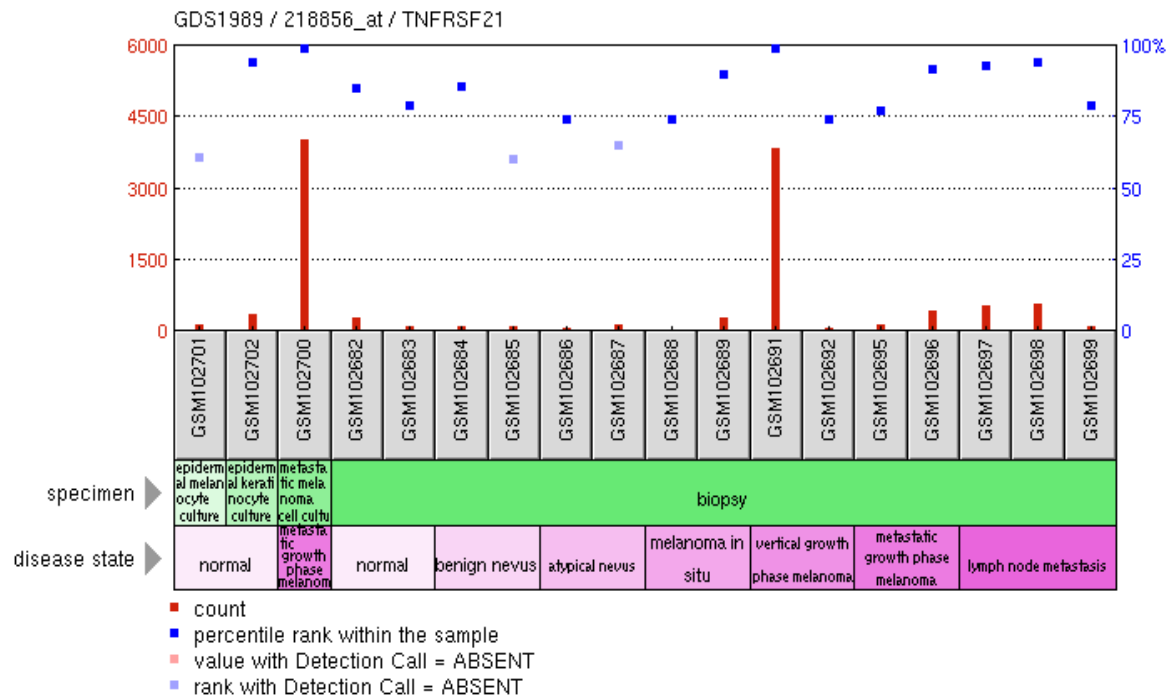
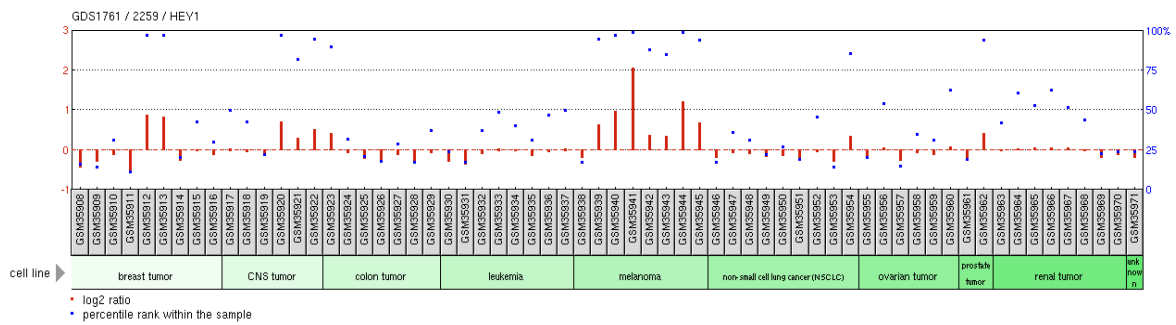


Figure 5: Beispiel des *affymetrix* array GDS1314 anhand des Gens TNFRSF21. Die Graphik illustriert durch die Höhe der Balken die Stärke der Genexpression in den Melanomzelllinien (von links nach rechts): Mel Juso, 607B, Sk-mel 28, A375 und 518A2. Quelle: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/tools/profileGraph.cgi?ID=GDS1314:214581\\_x\\_at](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/tools/profileGraph.cgi?ID=GDS1314:214581_x_at)



**Figure 6:** Beispiel des *affymetrix array* GDS1989 anhand des Gens TNFRSF21. Die Graphik illustriert durch die Höhe der Balken die Stärke der Genexpression in kultivierten Zelllinien (grüner Balken, specimen 1-3, hellgrün, links) und Zellen aus Biopsien (grüner Balken specimen 4, grün, rechts). Bei den Zelllinien handelt es sich um epidermale Melanozyten (specimen 1), epidermale Keratinozyten (specimen 2) und metastasierte Melanomzellen (specimen 3). Die Biopsien werden unterteilt in (von links nach rechts, lila Balken, *disease state*): normale Haut, benigner Nävus, atypischer Nävus, Melanoma in situ, *vertical growth phase melanoma*, metastasiertes Melanom und Lymphknotenmetastase eines Melanoms. Quelle: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/tools/profileGraph.cgi?ID=GDS1989:218856\\_at](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/tools/profileGraph.cgi?ID=GDS1989:218856_at)

Der letzte *array*, dessen Analyse mit in den Entscheidungsprozess mit einbezogen wird, ist GDS1761 (Beispiel Fig. 7). Dieser *array* soll als Abschluss einen weiteren Aspekt in die Überlegungen mit einfließen lassen. Dieser Aspekt ist die Spezifität des fraglichen Gens für das Melanom im Gegensatz zu anderen Tumorentitäten. Der *array* untersucht die Expression von Genen verschiedener Tumorzelllinien im Vergleich. Diese Tumorentitäten sind Brusttumore, primäre ZNS-Tumore, Kolontumore, Leukämien, Melanome, nicht kleinzelliges Bronchialkarzinom (NSCLC), ovariale Tumore, Prostata Tumore, Nierentumore sowie Tumorgewebe unbekannter Herkunft. Die in GDS1761 verwendete Bezeichnung „Tumor“ ist ungenau. Auch die Leukämien werden nicht näher spezifiziert. Aus dem Kontext heraus, und auf Grund der Tatsache, dass hier ein Vergleich mit malignen Tumoren zumindest der Pigmentzellen sowie des Lungengewebes angestellt wurde, lässt jedoch vermuten, dass es sich auch bei den anderen Geweben um maligne Tumore bzw. aggressive Varianten der Leukämien handeln dürfte.



**Figure 7:** Beispiel des *affymetrix array* GDS1761 anhand des Gens HEY1. Die Graphik illustriert durch die Höhe der Balken die Stärke der Genexpression in Zellen verschiedener Tumorgewebe. Es werden unterschieden (von links nach rechts): Brusttumor, ZNS-Tumor, Kolontumor, Leukämie, Melanom, nicht kleinzelliges Bronchialkarzinom, Ovarialtumor, Prostata tumor, Nierentumor und Tumorgewebe unbekannter Herkunft. Quelle: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/tools/profileGraph.cgi?ID=GDS1761:2259>

Aus der Zusammenschau dieser insgesamt sieben verschiedenen Arrays und ihrer Ergebnisse kann nun eine sinnvolle Analyse der Expressionsmuster stattfinden.

Die folgenden Tabellen (Tab. 3, Tab. 4) zeigen in alphabetischer Reihenfolge die ersten beiden Gruppen von Genen, die anhand von GDS1375 in die engere Auswahl genommen wurden.

#### Überexprimierte Gene (nach GDS1375):

|   |  |  |
|---|--|--|
| ABHD2 (abhydrolase domain containing 2)             | ABR (active BCR-related gene)  | ACLY (ATP citrate lyase)   |
| AD000092 (Homo sapiens DNA from chromosome 19p13.2) | AF041811 (Homo sapiens ETS related protein-growth factor receptor tyrosine kinase fusion proteins) | AI561354 (tq48e02.x1 NCI_CGAP_Ut1 Homo sapiens cDNA clone IMAGE)           |
| AI738802 (Transcribed locus)                        | AK2 (Adenylate kinase 2)   | AL049795 (Human DNA sequence from clone RP4-622L5 on chromosome 1p34,2-36) |
| AL109696 (CDNA FLJ37610 fis, clone BRCOC2011398)    | ANP32A (acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family)                                    | AP3D1 (Adaptor-related protein complex 3)                                  |
| ARF1 (ADP-ribosylation factor 1)                    | ARHGDI1 (Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha)   | ARNT2 (aryl-hydrocarbon receptor nuclear translocator 2)                   |

|  |  |   |
|--|--|---|
| ARPC1A (actin related protein 2/3 complex, subunit 1A)           | ARPC1B (actin related protein 2/3 complex, subunit 1B)                   | ATP5J2 (ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex)                        |
| ATP6V0E2 (ATPase, H+ transporting V0 subunit e2)                 | AU149305 (NT2RM4 Homo sapiens cDNA clone NT2RM4002036 3-, mRNA sequence) | AV713053 (Transcribed locus)  |
| AW612311 (CDNA FLJ38130 fis, clone D6OST2000464)                 | BAX (BCL2-associated X protein)  | BCL2A1 (BCL2-related protein A1)  |
| BE465032 (Transcribed locus, strongly similar to NP_001017510.1) | BE568134 (601341661F1 NIH_MGC_53 Homo sapiens cDNA clone IMAGE)          | BIN3 (bridging integrator 3 MGC14978)   |
| BUD31 (BUD31 homolog (S. cerevisiae))                            | C7orf49 (chromosome 7 open reading frame 49 FLJ22450)                    | CAPG (capping protein (actin filament) gelsolin-like AFCP)                              |
| CDC37-cell division cycle 37 homolog (S. cerevisiae)             | CDH3 (cadherin 3, type 1)  | CDK5 (cyclin-dependent kinase 5)  |
| CDK5RAP2 (CDK5 regulatory subunit associated protein 2)          | CDKN2A (cyclin-dependent kinase inhibitor 2)                             | CDKN2AIP (CDKN2A interacting protein CARF)  |
| CHP2 (calcineurin B homologous protein 2)                        | CIB1 (calcium and integrin binding 1)                                    | CITED1 (Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain) |
| CKS2 (CDC28 protein kinase regulatory subunit 2)                 | CLN6 (ceroid-lipofuscinosis, neuronal 6, late infantile)                 | CNIH3( cornichon homolog 3 (Drosophila))  |
| COMMD4 (COMM domain containing 4)                                | COX4I2 (cytochrome c oxidase subunit IV isoform 2)                       | COX5A (cytochrome c oxidase subunit Va)   |
| CPEB1 (cytoplasmic polyadenylation element binding protein 1)    | CRIP2 (cysteine-rich protein 2)  | CRYAB (crystallin, alpha B)   |
| CSGlcA (T-chondroitin sulfate glucuronyltransferase)             | CTNNA2 (catenin (cadherin-associated protein), alpha 2)                  | CTSB (Cathepsin B APPS)   |
| CTSH (cathepsin H ACC-4)   | CUL1 (cullin 1)  | DBNDD1 (dysbindin (dystrobrein binding protein 1) domain containing 1)                  |
| DDX17 (DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 17)                | DFNA5 (deafness, autosomal dominant 5)                                   | DNAJB6 (DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 6)                                    |
| DUSP4 (dual specificity phosphatase 4)                           | ERF (Ets2 repressor factor PE-2)   | ETV5 (Ets variant gene 5)   |
| FAM134B (Family with sequence similarity 134, member B)          | FANCI-Fanconi anemia, complementation group I)                           | FASTK (Fas-activated serine; threonine kinase FAST)                                     |
| FGF1 (fibroblast growth factor 1)                                | FHOD3 (formin homology 2 domain containing 3)                            | FJX1 (four jointed box 1 (Drosophila))  |
| FKBP10 (FK506 binding protein 10)                                | G6PC3 (catalytic 3-Glucose 6 phosphatase)                                | GDF1 (growth differentiation factor 1)  |
| GDF15 (growth differentiation factor 15)                         | GIT1 (G protein-coupled receptor kinase interactor 1)                    | GLRX2 (glutaredoxin 2 RP11-101E13.4)  |
| GNPDA1 (Glucosamine-6-phosphate deaminase 1)                     | GPI (glucose phosphate isomerase)  | GPR56 (G protein-coupled receptor 56)   |
| GPR143 (G protein-coupled  | GSTO1 (glutathione S-  | H2AFX (H2A histone family,  |



|  |   |  |
|--|---|--|
| receptor 143)  | transferase omega 1)  | member X H2A.X)  |
| HEY1 (Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1)   | HNRNPUL1 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like 1)       | HPCAL1 (hippocalcin-like 1)  |
| HSP90B1 (heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 1)  | HSPH1 (Heat shock 105kDa/110kDa protein 1)                        | IDH3A (Isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) alpha)                                      |
| IGF2R (insulin-like growth factor 2 receptor )             | IL16 (interleukin 16)   | IMPDH1 (IMP (inosine monophosphate) dehydrogenase 1)                                 |
| JUND (Jun D proto-oncogene)                                | KIAA0265 (KIAA0265 protein)                                       | L1CAM (L1 cell adhesion molecule)  |
| LZTS1 (leucine zipper, putative tumor suppressor 1)        | M6PR (Mannose-6-phosphate receptor)                               | MAD1L1 (MAD1 mitotic arrest deficient-like 1)  |
| MDH2 (Malate dehydrogenase 2)                              | METRNL (meteorin)   | MICAL3 (microtubule associated monooxygenase)  |
| MIF (macrophage migration inhibitory factor)               | MYO9B (myosin IXB)  | NACA (nascent polypeptide-associated complex alpha)                                  |
| NANS (N-acetylneuraminic acid synthase)                    | NCAPG (non-SMC condensin I complex)                               | NTRK3 (neurotrophic tyrosine kinase type 3)  |
| NUP93 (nucleoporin 93kDa)                                  | PAFAH1B3 (platelet-activating factor acetylhydrolase, isoform Ib) | PARN (poly(A)-specific ribonuclease)   |
| PARP4 (poly (ADP-ribose) polymerase family, member 4)      | PDAP1 (PDGFA associated protein 1)                                | PDIA4 (protein disulfide isomerase family A, member 4)                               |
| PDXK (pyridoxal (pyridoxine, vitamin B6) kinase)           | PEX6 (peroxisomal biogenesis factor)                              | PHACTR1 (Phosphatase and actin regulator 1)  |
| PI4K2A (Phosphatidylinositol 4-kinase type 2 alpha)        | PICALM (Phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein)   | PKM2 (pyruvate kinase, muscle)   |
| PLOD1 (procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1) | PLOD3 (procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3)        | PLXNB1 (Plexin B1)   |
| PLXNC1 (Plexin C1)   | POM121 (POM121 membrane glycoprotein)                             | POR (P450 (cytochrome) oxidoreductase)   |
| PRKCSH (protein kinase C substrate 80K-H)                  | PRPF4 (PRP4 pre-mRNA processing factor 4 homolog)                 | PSEN2 (presenilin 2)   |
| PTCD1 (pentatricopeptide repeat domain 1)                  | RENBP (renin binding protein)                                     | RRM2 (ribonucleotide reductase M2)   |
| SAPS1 (SAPS domain family, member 1)                       | SDC3 (syndecan 3)   | SEMA3B (semaphorin 3B)   |
| SILV (silver homolog (mouse))                              | SLC6A10P (solute carrier family 6, member 10)                     | SLC6A15 (solute carrier family 6, member 15)   |
| SLC16A6 (solute carrier family 16, member 6)               | SLC35B1 (solute carrier family 35, member B1)                     | SMARCA4 (SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin) |
| SNCA (synuclein, alpha)                                    | SOX4 (SRY-box 4)  | SOX10 (SRY-box 10)   |
| SPP1 (secreted phosphoprotein 1)                           | STIP1 (Stress-induced-phosphoprotein 1)                           | STXBP1 (syntaxin binding protein 1)  |
| T87225 (yc81f06.s1 Soares)                                 | TBCD (tubulin folding cofactor)                                   | TBX2 (T-box 2)   |

|   |  |   |
|---|--|---|
| infant brain 1NIB Homo sapiens cDNA clone)                                    | D)   |   |
| TFAP2C (transcription factor AP-2 gamma)                                      | TFPT (TCF3 fusion partner)                                       | TGDS (TDP-glucose 4,6-dehydratase)                            |
| TMEM8 (Transmembrane protein 8)   | TNPO3 (transportin 3)  | TOP2A (Topoisomerase II alpha)                                |
| TPX2 (microtubule-associated, homolog (Xenopus laevis))                       | TNFRSF21 (tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21) | TRAK2 (Trafficking protein, kinesin binding 2)                |
| TRIB2 (tribbles homolog 2 (Drosophila))                                       | TUBB2A (Tubulin, beta 2A)  | TUBB2B (Tubulin, beta 2B)                                     |
| TYR (tyrosinase)  | U88968 (Human alpha enolase like 1)                              | UBE2H (ubiquitin-conjugating enzyme E2H)                      |
| UBE2M (ubiquitin-conjugating enzyme E2M)                                      | UBE2S (ubiquitin-conjugating enzyme E2S)                         | UROS (uroporphyrinogen III synthase)                          |
| W47179 (zc34d07s1 Soares senescent fibroblasts NbHSF Homo sapiens cDNA clone) | ZNF274 (zinc finger protein 274)                                 | ZWILCH (Zwilch, kinetochore associated, homolog (Drosophila)) |

**Tabelle 3:** Gene (Genkürzel) und Namen der kodierten Proteine, die in GDS1375 als überexprimiert bewertet wurden.

#### Unterexprimierte Gene (nach GDS1375):

|   |   |   |
|---|---|---|
| AA761181 (nz09g03.s1 NCI_CGAP_GCB1 Homo sapiens cDNA clone) | ABCA8 (ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 8) | ABHD9 (abhydrolase domain containing 9)                   |
| ABLIM1 (actin binding LIM protein 1)                        | AHNAK (AHNAK nucleoprotein)                                 | AK000168 (Homo sapiens cDNA FLJ20161 fis)                 |
| AKR1C3 (aldo-keto reductase family 1, member C3)            | ALDH3A2 (aldehyde dehydrogenase 3 family, member A2)        | ANG (Angiogenin, ribonuclease)                            |
| ANGPTL7 (angiopoietin-like 7)                               | ANXA8L2 (annexin A8-like 2)                                 | AQP3 (Aquaporin 3 (Gill blood group))                     |
| AW129056 (Transcribed locus)                                | AZGP1 (alpha-2-glycoprotein 1)                              | BBOX1 (butyrobetaine (gamma), 2-oxoglutarate dioxygenase) |
| BCL11A (B-cell CLL; lymphoma 11A)                           | C1orf116 (chromosome 1 open reading frame 116)              | CCL27 (chemokine (C-C motif) ligand 27)                   |
| CD24 (CD24 molecule)  | CDCP1 (CUB domain containing protein 1)                     | CFD (complement factor D)                                 |
| CFHR1 (complement factor H-related 1)                       | CHL1 (cell adhesion molecule with homology to L1CAM)        | CLCA2 (CLCA family member 2)                              |
| CLU (Clusterin)   | COBL (Cordon-bleu homolog (mouse))                          | CST6 (cystatin E/M)                                       |
| CSTA (cystatin A)   | CXCL14 (chemokine (C-X-C motif) ligand 14)                  | CYP4F12 (cytochrome P450, family 4, subfamily F,          |

|   |   |   |
|---|---|---|
|   |   | polypeptide 12)   |
| DEFB1 (defensin, beta 1 BD1)                      | DKFZP586H2123<br>(Regeneration associated muscle protease)                              | DSC1 (desmocollin 1)                                      |
| DSC3 (desmocollin 3)                              | DSG1 (desmoglein 1)   | DSP (desmoplakin)   |
| DST (dystonin)                                    | DUOX1 (dual oxidase 1)  | ECHDC2 (enoyl Coenzyme A hydratase domain containing 2)   |
| EGFR (Epidermal growth factor receptor)           | ELOVL4 (elongation of very long chain fatty acids (FEN1/Elo2, SUR4/Elo3, yeast)-like 4) | EPB41L4B (erythrocyte membrane protein band 4.1 like 4B)  |
| EPS8L1 (EPS8-like 1)                              | EVPL (envoplakin)   | F3 (coagulation factor III)                               |
| FGFR2 (fibroblast growth factor receptor 2a)      | FGFR3 (fibroblast growth factor receptor 3)   | FLG2 (filaggrin family member 2)                          |
| FLJ21511 (hypothetical protein FLJ21511)          | GATA3 (GATA binding protein 3)  | GHR (growth hormone receptor)                             |
| GJA1 (gap junction protein, alpha 1)              | GJB3 (gap junction protein, beta 3)   | HIP1R (huntingtin interacting protein 1 related)          |
| HOPX (HOP homeobox Cameo)                         | ITGB4 (Integrin, beta 4)  | KLF4 (Kruppel-like factor 4 (gut))                        |
| KLK7 (kallikrein-related peptidase 7)             | KLK11 (kallikrein-related peptidase 11)   | KRT1 (keratin 1)  |
| KRT5 (keratin 5)                                  | KRT10 (keratin 10)  | KRT14 (keratin 14)  |
| KRT15 (keratin 15)                                | KRT23 (keratin 23)  | LAMA3 (laminin, alpha 3)                                  |
| LEPREL1 (leprecan-like 1)                         | LGALS7 (lectin, galactoside-binding, soluble, 7)  | LOR (loricrin)  |
| LPAR1 (Lysophosphatidic acid receptor 1)          | LRIG1 (leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1)                          | LRP4 (Low density lipoprotein receptor-related protein 4) |
| LRRC1 (leucine rich repeat containing 1)          | LY6D (lymphocyte antigen 6 complex, locus D E48)  | LYPD3 (LY6PLAUR domain containing 3)                      |
| MAOA (monoamine oxidase A)                        | NDRG2 (NDRG family member 2)  | NEBL (nebulin)  |
| NET1 (neuroepithelial cell transforming gene 1)   | NTRK2 (Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2)                                  | P2RY14 (purinergic receptor P2Y, G-protein coupled 14)    |
| PALMD (palmdelphin)                               | PBX1 (Hypothetical LOC100131938)  | PCDH21 (Protocadherin 21)                                 |
| PDZD2 (PDZ domain containing 2)                   | PHYHIP (phytanoyl-CoA 2-hydroxylase interacting protein)                                | PKP1 (Plakophilin 1)                                      |
| PLLPL (plasma membrane proteolipid)               | PPFIBP2 (PTPRF interacting protein, binding protein 2)                                  | PPL (periplakin)  |
| PRSS3 (Protease, serine, 3)                       | PTPN3 (protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 3)                               | PTPRF (Protein tyrosine phosphatase, receptor type, F)    |
| RAB25 (RAB25, member RAS oncogene family)         | RBM35B (RNA binding motif protein 35B)  | SCEL (sciellin)   |
| SCNN1A (sodium channel, nonvoltage-gated 1 alpha) | SEPP1 (selenoprotein P, plasma, 1)  | SFN (stratifin)   |

|   |  |  |
|---|--|--|
| SLC38A1 (solute carrier family 38, member 1)            | SORBS2 (sorbin and SH3 domain containing 2)            | SOSTDC1 (sclerostin domain containing 1)           |
| SPARCL1 (SPARC-like 1)                                  | SPINK5 (serine peptidase inhibitor, Kazal type 5)      | SPINT1 (serine peptidase inhibitor, Kunitz type 1) |
| SRD5A1 (steroid-5-alpha-reductase, alpha polypeptide 1) | TACSTD2 (tumor-associated calcium signal transducer 2) | TJP2 (tight junction protein 2 (zona occludens 2)) |
| TPD52L1 (tumor protein D52-like 1)                      | TRIM29 (tripartite motif-containing 29)                | ZNF185 (zinc finger protein 185)                   |
| ZNF750 (zinc finger protein 750)                        |  |  |

**Tabelle 4:** Gene (Genkürzel) und Namen der kodierten Proteine, die in GDS1375 als unterexprimiert bewertet wurden.

Diese immense Anzahl wurde nun anhand der restlichen *arrays* erneut verglichen, was durch die folgende tabellarische Aufstellung illustriert werden soll (Tab. 5, Tab. 6). Ein Haken (✓) demonstriert, dass das Gen laut dem Ergebnis des *arrays* spezifisch in den Melanozyten oder im Rahmen deren maligner Progression reguliert zu sein scheint. Dabei ist sowohl eine deutliche Steigerung, wie auch ein Abfallen der Expression gemeint. Ein Kreuz (✗) symbolisiert das Gegenteil. Bei einem Bindestrich (-) ist das Ergebnis als neutral zu werten. Sollte kein Symbol auftauchen, so ist der jeweilige Array für das jeweilige Gen nicht durchgeführt worden.

#### Überexprimierte Gene:

| GEN      | GDS2081<br>(Keratinocyten 1) | GDS1505<br>(Keratinocyten 2) | GDS1965<br>(Progression 1) | GDS1989<br>(Progression 2) | GDS1314<br>(Melanomzell-<br>linien) | GDS1761<br>(Spezifität) |
|----------|------------------------------|------------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------------------------------|-------------------------|
| ABHD2    |                              | ✓                            | ✓                          | ✓                          | ✓                                   |                         |
| ABR      | ✗                            | ✓                            | ✗                          | ✗                          | ✓                                   |                         |
| ACLY     | ✗                            | ✗                            | ✓                          | -                          | ✓                                   | -                       |
| AD000092 | ✗                            | ✗                            | -                          | -                          | ✓                                   |                         |
| AF041811 |                              | -                            | -                          | ✓                          | ✓                                   |                         |
| AI561354 |                              | ✗                            | -                          | -                          | ✓                                   |                         |
| AI738802 |                              | ✓                            | -                          | ✗                          | ✗                                   |                         |
| AK2      | ✗                            | -                            | ✓                          | ✓                          | ✓                                   | ✓                       |
| AL049795 |                              | -                            | ✓                          | ✗                          | ✓                                   |                         |
| AL109696 | ✓                            | ✗                            | ✓                          | -                          | ✗                                   |                         |
| ANP32A   | ✗                            | ✗                            | ✓                          | ✓                          | ✓                                   |                         |
| AP3D1    | ✗                            | ✗                            | -                          | -                          | ✓                                   | ✓                       |
| ARF1     | ✗                            | ✗                            | -                          | -                          | ✓                                   |                         |

| GEN      | GDS2081<br>(Keratinocyten<br>1) | GDS1505<br>(Keratinocyten<br>2) | GDS1965<br>(Progression 1) | GDS1989<br>(Progression 2) | GDS1314<br>(Melanomzell-<br>linien) | GDS1761<br>(Spezifität) |
|----------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------------------------------|-------------------------|
| ARHGDIA  | ✗                               | ✗                               | ✓                          | ✗                          | ✓                                   |                         |
| ARNT2    | ✓                               | ✓                               | ✓                          | ✓                          | ✓                                   |                         |
| ARPC1A   | ✗                               | ✗                               | ✓                          | -                          | ✓                                   | ✓                       |
| ARPC1B   | ✗                               | ✗                               | -                          | ✓                          | ✓                                   |                         |
| ATP5J2   | ✗                               | ✗                               | -                          | ✓                          | ✓                                   | -                       |
| ATP6V0E2 |                                 | ✗                               | ✓                          | -                          | ✓                                   | ✓                       |
| AU149305 |                                 | -                               | ✓                          | -                          | ✓                                   |                         |
| AV713053 |                                 | -                               | -                          | -                          | ✓                                   |                         |
| AW612311 |                                 | ✗                               | -                          | ✓                          | ✓                                   |                         |
| BAX      | ✗                               | ✗                               | ✗                          | ✗                          | ✓                                   |                         |
| BCL2A1   | ✓                               | -                               | ✓                          | ✓                          | ✓                                   |                         |
| BE465032 |                                 | ✗                               | ✓                          | ✓                          | ✓                                   |                         |
| BE568134 |                                 | ✗                               | ✓                          | ✓                          | ✓                                   |                         |
| BIN3     |                                 | -                               | ✗                          | -                          | ✓                                   |                         |
| BUD31    | ✗                               | -                               | ✓                          | ✓                          | ✓                                   | -                       |
| C7orf49  |                                 | ✗                               | ✓                          | ✓                          | ✓                                   |                         |
| CAPG     | ✗                               | ✗                               | ✓                          | -                          | ✓                                   | ✓                       |
| CDC37    | ✗                               | ✗                               | -                          | ✓                          | ✓                                   | -                       |
| CDH3     | ✗                               | ✗                               | ✗                          | -                          | ✗                                   | ✗                       |
| CDK5     | ✗                               | ✗                               | -                          | ✗                          | ✓                                   | ✓                       |
| CDK5RAP2 |                                 | -                               | -                          | ✓                          | -                                   | -                       |
| CDKN2A   | ✗                               | ✗                               | ✓                          | ✓                          | ✓                                   | ✗                       |
| CDKN2AIP |                                 | -                               | -                          | ✓                          | ✓                                   |                         |
| CHP2     | ✓                               | ✓                               | -                          | ✗                          | ✗                                   |                         |
| CIB1     | ✗                               | ✗                               | -                          | ✓                          | ✓                                   | -                       |
| CITED1   | ✓                               | ✗                               | ✗                          | ✗                          | ✓                                   |                         |
| CKS2     | ✗                               | ✗                               | -                          | -                          | ✓                                   | -                       |
| CLN6     |                                 | -                               | ✓                          | ✗                          | ✓                                   |                         |
| CNIH3    | ✓                               | -                               | ✓                          | ✓                          | ✓                                   |                         |
| COMMD4   |                                 | ✗                               | -                          | ✓                          | ✓                                   | ✓                       |
| COX4I2   |                                 | ✗                               | -                          | ✗                          | ✓                                   |                         |
| COX5A    | ✗                               | ✗                               |                            | -                          | ✓                                   | -                       |
| CPEB1    |                                 |                                 | ✓                          | -                          | ✓                                   |                         |
| CRIP2    | ✗                               | ✓                               | ✓                          | -                          | ✓                                   | -                       |
| CRYAB    |                                 | ✓                               | ✓                          | ✓                          | -                                   | ✗                       |
| CSGlcA   |                                 | -                               | ✓                          | ✓                          | ✓                                   |                         |
| CTNNA2   | ✓                               | ✗                               | ✓                          | -                          | ✗                                   |                         |
| CTSB     |                                 | -                               | -                          | ✓                          | ✓                                   | ✓                       |
| CTSH     | ✓                               | ✗                               | ✓                          | -                          | ✓                                   | ✓                       |
| CUL1     | ✗                               | ✗                               | ✓                          | ✓                          | ✓                                   | -                       |
| DBNDD1   |                                 | -                               | ✓                          | -                          | -                                   |                         |
| DDX17    | ✗                               | -                               | ✓                          | -                          | ✓                                   | ✓                       |
| DFNA5    | ✗                               | ✗                               | ✗                          | -                          | ✓                                   | ✗                       |
| DNAJB6   | ✗                               | ✓                               | ✓                          | ✓                          | ✓                                   |                         |
| DUSP4    | -                               | ✗                               | ✓                          | -                          | ✓                                   | ✓                       |

| GEN      | GDS2081<br>(Keratinocyten<br>1) | GDS1505<br>(Keratinocyten<br>2) | GDS1965<br>(Progression 1) | GDS1989<br>(Progression 2) | GDS1314<br>(Melanomzell-<br>linien) | GDS1761<br>(Spezifität) |
|----------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------------------------------|-------------------------|
| ERF      | ✗                               | ✗                               | ✓                          | -                          | ✓                                   |                         |
| ETV5     | ✗                               | ✗                               | -                          | -                          | ✓                                   | ✓                       |
| FAM134B  |                                 | ✓                               | ✓                          | -                          | ✓                                   |                         |
| FANCI    | ✗                               | ✗                               | ✓                          | ✓                          | ✓                                   | -                       |
| FASTK    | ✗                               | -                               | -                          | -                          | ✓                                   | ✓                       |
| FGF1     | ✓                               | -                               | ✓                          | ✓                          | ✓                                   | -                       |
| FHOD3    |                                 | ✓                               | ✓                          | ✓                          | ✓                                   |                         |
| FJX1     |                                 | ✗                               | -                          | ✗                          | ✓                                   |                         |
| FKBP10   |                                 | ✓                               | ✓                          | -                          | ✓                                   | -                       |
| G6PC3    |                                 | ✗                               | -                          | -                          | ✓                                   |                         |
| GDF1     |                                 | -                               | -                          | -                          | ✗                                   |                         |
| GDF15    | ✗                               | -                               | -                          | -                          | ✓                                   |                         |
| GIT1     |                                 | ✗                               | -                          | -                          | ✓                                   | -                       |
| GLRX2    |                                 | ✗                               | -                          | -                          | ✓                                   | -                       |
| GNPDA1   | ✗                               | ✗                               | -                          | ✗                          | ✓                                   |                         |
| GPI      | ✗                               | ✗                               | -                          | ✗                          | ✓                                   | -                       |
| GPR56    | ✗                               | -                               | ✓                          | -                          | ✓                                   | ✓                       |
| GPR143   | ✓                               | ✓                               | -                          | ✗                          | ✓                                   |                         |
| GSTO1    | ✗                               | ✗                               | -                          | ✗                          | ✓                                   |                         |
| H2AFX    | ✗                               | ✗                               | ✗                          | ✗                          | ✓                                   |                         |
| HEY1     |                                 | ✓                               | ✓                          | ✓                          | ✓                                   | ✓                       |
| HNRNPUL1 | ✗                               | -                               | ✓                          | -                          | ✓                                   |                         |
| HPCAL1   | ✗                               | ✗                               | ✓                          | ✗                          | ✓                                   | ✓                       |
| HSP90B1  | ✗                               | ✗                               | ✓                          | ✓                          | ✓                                   | -                       |
| HSPH1    | ✓                               | ✗                               | ✓                          | ✓                          | ✓                                   | -                       |
| IDH3A    | ✗                               | ✗                               | ✓                          | ✓                          | ✓                                   | -                       |
| IGF2R    | -                               | ✗                               | ✓                          | -                          | ✓                                   | ✓                       |
| IL16     | ✓                               | ✗                               | ✓                          | ✓                          | ✓                                   | ✗                       |
| IMPDH1   | ✗                               | ✗                               | ✓                          | -                          | ✓                                   | -                       |
| JUND     | ✗                               | ✓                               | -                          | ✗                          | ✓                                   |                         |
| KIAA0265 | ✗                               | ✓                               | ✓                          | ✓                          | ✓                                   | -                       |
| L1CAM    |                                 | ✓                               | ✓                          | ✗                          | ✓                                   |                         |
| LZTS1    |                                 | ✓                               | ✓                          | -                          | ✓                                   |                         |
| M6PR     | ✗                               | ✗                               | -                          | -                          | ✓                                   |                         |
| MAD1L1   | ✓                               | -                               | ✗                          | ✗                          | ✓                                   |                         |
| MDH2     | ✗                               | ✓                               | -                          | ✗                          | ✓                                   | ✓                       |
| METRNL   |                                 | ✗                               | ✓                          | -                          | ✓                                   |                         |
| MICAL3   | ✗                               | ✗                               | ✓                          | ✓                          | ✓                                   |                         |
| MIF      | ✗                               | ✗                               | -                          | ✓                          | ✓                                   |                         |
| MYO9B    | ✗                               | -                               | ✓                          | ✗                          | ✓                                   | ✓                       |
| NACA     | ✗                               | -                               | -                          | ✓                          | ✓                                   |                         |
| NANS     |                                 | ✗                               | -                          | ✓                          | ✓                                   |                         |
| NCAPG    |                                 | ✗                               | ✓                          | ✓                          | ✓                                   |                         |
| NTRK3    | ✓                               | -                               | ✓                          | -                          | ✓                                   | -                       |
| NUP93    | ✗                               | ✗                               | ✓                          | -                          | ✓                                   | ✓                       |

| GEN      | GDS2081<br>(Keratinocyten<br>1) | GDS1505<br>(Keratinocyten<br>2) | GDS1965<br>(Progression 1) | GDS1989<br>(Progression 2) | GDS1314<br>(Melanomzell-<br>linien) | GDS1761<br>(Spezifität) |
|----------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------------------------------|-------------------------|
| PAFAH1B3 | ✗                               | ✗                               | -                          | -                          | ✓                                   |                         |
| PARN     | ✗                               | -                               | ✓                          | ✓                          | ✓                                   |                         |
| PARP4    | -                               | ✗                               | ✓                          | ✓                          | ✓                                   | -                       |
| PDAP1    | ✗                               | ✗                               | ✓                          | -                          | ✓                                   |                         |
| PDIA4    | ✗                               | ✗                               | ✓                          | ✓                          | ✓                                   | ✗                       |
| PDXK     | ✗                               | ✗                               | ✓                          | -                          | ✓                                   | -                       |
| PEX6     | ✗                               | -                               | ✓                          | -                          | ✓                                   | ✓                       |
| PHACTR1  |                                 | -                               | ✓                          | ✗                          | ✓                                   |                         |
| PI4K2A   | ✗                               | ✗                               | ✓                          | ✗                          | ✓                                   | ✓                       |
| PICALM   | ✗                               | ✗                               | -                          | ✓                          | ✓                                   | ✗                       |
| PKM2     | ✗                               | ✗                               | ✓                          | -                          | ✓                                   | -                       |
| PLOD1    |                                 | -                               | ✓                          | ✓                          | ✓                                   | ✓                       |
| PLOD3    | ✗                               | ✗                               | ✓                          | ✗                          | ✓                                   | -                       |
| PLXNB1   | ✗                               | ✗                               | ✗                          | ✗                          | ✗                                   |                         |
| PLXNC1   |                                 | ✓                               | -                          | ✓                          | -                                   |                         |
| POM121   | ✗                               | ✗                               | ✓                          | -                          | ✓                                   | -                       |
| POR      | ✗                               | -                               | ✗                          | ✗                          | ✓                                   | -                       |
| PRKCSH   | ✗                               | -                               | ✓                          | ✗                          | ✓                                   | -                       |
| PRPF4    | ✗                               | ✗                               | -                          | ✓                          | ✓                                   | ✗                       |
| PSEN2    | ✗                               | ✓                               | ✗                          | -                          | ✓                                   | ✓                       |
| PTCD1    |                                 | -                               | ✓                          | -                          | ✓                                   |                         |
| RENBP    | ✗                               | ✓                               | ✗                          | ✗                          | ✗                                   |                         |
| RRM2     | ✗                               | ✗                               | ✓                          | ✗                          | ✓                                   | ✓                       |
| SAPS1    | ✗                               | ✗                               | ✓                          | -                          | ✓                                   |                         |
| SDC3     | ✗                               | -                               | ✓                          | -                          | ✓                                   |                         |
| SEMA3B   |                                 | ✓                               | ✓                          | ✓                          | ✗                                   | ✓                       |
| SILV     | ✓                               | ✓                               | -                          | ✓                          | ✓                                   |                         |
| SLC6A10P |                                 | ✗                               | ✓                          | ✗                          | ✓                                   |                         |
| SLC6A15  | -                               | ✗                               | ✗                          | ✓                          | ✓                                   |                         |
| SLC16A6  | -                               | ✓                               | ✓                          | ✗                          | ✓                                   |                         |
| SLC35B1  | ✗                               | ✗                               | -                          | -                          | ✓                                   | -                       |
| SMARCA4  | ✗                               | ✗                               | ✓                          | ✗                          | ✓                                   | ✓                       |
| SNCA     |                                 | -                               | ✗                          | -                          | ✓                                   | -                       |
| SOX4     | ✗                               | ✓                               | ✗                          | ✓                          | ✓                                   | -                       |
| SOX10    |                                 | ✓                               | ✗                          | ✗                          | ✓                                   |                         |
| SPP1     | ✓                               | -                               | ✓                          | ✓                          | ✓                                   | -                       |
| STIP1    | ✗                               | ✗                               | ✗                          | -                          | ✓                                   | ✗                       |
| STXBP1   | ✗                               | ✗                               | ✗                          | -                          | ✓                                   | ✓                       |
| T87225   |                                 | -                               | ✓                          | -                          | -                                   |                         |
| TBCD     | ✗                               | ✗                               | -                          | ✗                          | ✓                                   |                         |
| TBX2     | ✓                               | -                               | ✓                          | -                          | ✓                                   |                         |
| TFAP2C   | ✗                               | ✓                               | ✓                          | -                          | ✓                                   |                         |
| TFPT     |                                 | -                               | -                          | ✓                          | ✓                                   |                         |
| TGDS     | ✗                               | ✓                               | ✓                          | -                          | ✓                                   |                         |
| TMEM8    |                                 | ✗                               | -                          | -                          | ✓                                   |                         |

| GEN      | GDS2081<br>(Keratinocyten<br>1) | GDS1505<br>(Keratinocyten<br>2) | GDS1965<br>(Progression 1) | GDS1989<br>(Progression 2) | GDS1314<br>(Melanomzell-<br>linien) | GDS1761<br>(Spezifität) |
|----------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------------------------------|-------------------------|
| TNFRSF21 | -                               | ✗                               | ✓                          | ✓                          | ✓                                   |                         |
| TNPO3    | -                               | ✗                               | ✓                          | ✓                          | ✓                                   |                         |
| TOP2A    | ✗                               | ✗                               | ✓                          | ✓                          | ✓                                   | ✗                       |
| TPX2     | ✗                               | ✗                               | ✓                          | -                          | ✓                                   | ✗                       |
| TRAK2    | ✗                               | ✓                               | ✗                          | -                          | ✓                                   | ✓                       |
| TRIB2    | ✗                               | ✓                               | -                          | ✓                          | ✓                                   | ✓                       |
| TUBB2A   | ✗                               | ✓                               | -                          | ✓                          | ✓                                   | -                       |
| TUBB2B   | ✗                               | ✓                               | -                          | ✓                          | -                                   | -                       |
| TYR      |                                 | ✓                               | ✗                          | ✓                          | ✓                                   | ✓                       |
| U88968   |                                 | ✗                               | ✓                          | ✓                          | ✓                                   |                         |
| UBE2H    | -                               | ✗                               | ✓                          | ✓                          | ✓                                   | ✗                       |
| UBE2M    | ✗                               | ✗                               | ✗                          | ✗                          | ✓                                   |                         |
| UBE2S    | ✗                               | ✗                               | -                          | ✗                          | ✓                                   | -                       |
| UROS     | ✗                               | ✗                               | ✗                          | ✗                          | ✓                                   | ✗                       |
| W47179   |                                 | ✓                               | ✓                          | -                          | ✓                                   |                         |
| ZNF274   | -                               | -                               | ✓                          | ✓                          | ✓                                   |                         |
| ZWILCH   |                                 | ✗                               | ✓                          | ✓                          | ✓                                   |                         |

**Tabelle 5:** Analyse der überexprimierten Gene aus Tab. 3 anhand der *affymetrix arrays* GDS2081, GDS1505, GDS1965, GDS1989, GDS1314 und GDS1761

#### Unterexprimierte Gene:

| GEN      | GDS2081<br>(Keratinocyten<br>1) | GDS1505<br>(Keratinocyten<br>2) | GDS1965<br>(Progression 1) | GDS1989<br>(Progression 2) | GDS1314<br>(Melanomzell-<br>linien) | GDS1761<br>(Spezifität) |
|----------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------------------------------|-------------------------|
| AA761181 |                                 | -                               | -                          | ✗                          | -                                   |                         |
| ABCA8    | ✓                               | ✓                               | ✗                          | ✗                          | ✓                                   |                         |
| ABHD9    |                                 | ✓                               | -                          | ✓                          | ✓                                   |                         |
| ABLIM1   | ✗                               | -                               | ✗                          | ✓                          | ✗                                   | -                       |
| AHNAK    | ✗                               | ✓                               | ✗                          | -                          | ✗                                   | -                       |
| AK000168 |                                 | -                               | -                          | ✗                          | ✗                                   |                         |
| AKR1C3   | -                               | -                               | ✗                          | -                          | ✗                                   | ✓                       |
| ALDH3A2  | ✗                               | ✓                               | ✗                          | ✓                          | ✗                                   | -                       |
| ANG      | ✓                               | ✓                               | -                          | ✓                          | -                                   | -                       |
| ANGPTL7  |                                 | ✓                               | ✗                          | -                          | ✓                                   |                         |
| ANXA8L2  | ✗                               | -                               | -                          | ✓                          | -                                   |                         |
| AQP3     | ✗                               | -                               | ✗                          | ✓                          | -                                   | ✓                       |
| AW129056 |                                 | ✓                               | -                          | ✓                          | ✓                                   |                         |
| AZGP1    | ✓                               | ✓                               | ✗                          | ✓                          | ✓                                   | ✓                       |
| BBOX1    | -                               | ✓                               | -                          | ✓                          | ✓                                   |                         |
| BCL11A   | ✗                               | ✓                               | ✗                          | ✓                          | ✓                                   |                         |
| C1orf116 |                                 | -                               | -                          | ✓                          | ✓                                   |                         |



| GEN           | GDS2081<br>(Keratinocyten<br>1) | GDS1505<br>(Keratinocyten<br>2) | GDS1965<br>(Progression 1) | GDS1989<br>(Progression 2) | GDS1314<br>(Melanomzell-<br>linien) | GDS1761<br>(Spezifität) |
|---------------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------------------------------|-------------------------|
| CCL27         | ✓                               | ✓                               | -                          | -                          | ✓                                   |                         |
| CD24          | ✗                               | ✗                               | -                          | -                          | -                                   |                         |
| CDCP1         |                                 | ✗                               | -                          | ✓                          | -                                   |                         |
| CFD           | ✗                               | ✓                               | -                          | ✓                          | ✓                                   | ✓                       |
| CFHR1         | ✓                               | ✓                               | ✗                          | ✗                          | ✓                                   | -                       |
| CHL1          | ✓                               | ✓                               | ✗                          | ✗                          | ✗                                   | ✓                       |
| CLCA2         | ✗                               | -                               | -                          | -                          | -                                   |                         |
| CLU           | ✗                               | ✓                               | ✗                          | ✓                          | ✗                                   | ✓                       |
| COBL          | ✓                               | ✓                               | -                          | ✓                          | -                                   |                         |
| CST6          | -                               | ✓                               | -                          | ✓                          | ✓                                   |                         |
| CSTA          | ✗                               | -                               | ✗                          | ✗                          | ✓                                   | ✓                       |
| CXCL14        |                                 | ✓                               | -                          | -                          | ✓                                   | ✓                       |
| CYP4F12       | ✗                               | ✓                               | -                          | ✓                          | ✓                                   |                         |
| DEFB1         | ✗                               | ✓                               | -                          | ✗                          | ✓                                   |                         |
| DKFZP586H2123 | ✓                               | ✓                               | ✗                          | -                          | ✓                                   |                         |
| DSC1          | ✗                               | ✓                               | -                          | ✓                          | ✓                                   |                         |
| DSC3          | -                               | -                               | ✗                          | ✓                          | ✗                                   |                         |
| DSG1          | -                               | ✓                               | -                          | ✓                          | ✓                                   | -                       |
| DSP           |                                 | -                               | ✗                          | ✓                          | -                                   | ✓                       |
| DST           | -                               | -                               | ✗                          | -                          | -                                   | -                       |
| DUOX1         |                                 | -                               | -                          | ✓                          | ✓                                   |                         |
| ECHDC2        |                                 | ✓                               | -                          | -                          | ✗                                   | ✓                       |
| EGFR          | ✗                               | ✗                               | ✗                          | -                          | -                                   | ✓                       |
| ELOVL4        |                                 | ✓                               | -                          | ✓                          | ✗                                   | -                       |
| EPB41L4B      |                                 | -                               | ✗                          | ✓                          | -                                   |                         |
| EPS8L1        |                                 | ✓                               | ✗                          | -                          | ✓                                   |                         |
| EVPL          | -                               | ✓                               | -                          | ✓                          | ✓                                   |                         |
| F3            | ✗                               | ✗                               | ✗                          | -                          | -                                   | ✓                       |
| FGFR2         | ✗                               | -                               | -                          | ✓                          | ✓                                   | ✗                       |
| FGFR3         | ✗                               | -                               | -                          | ✓                          | -                                   | -                       |
| FLG2          |                                 | ✓                               | ✗                          | -                          | -                                   |                         |
| FLJ21511      |                                 | -                               | -                          | -                          | ✓                                   |                         |
| GATA3         | ✗                               | ✓                               | -                          | ✓                          | -                                   | ✓                       |
| GHR           | ✗                               | ✓                               | -                          | ✓                          | ✗                                   | ✗                       |
| GJA1          | ✗                               | ✓                               | ✗                          | -                          | ✓                                   | ✓                       |
| GJB3          | ✗                               | ✗                               | -                          | -                          | -                                   |                         |
| HIP1R         | ✗                               | ✓                               | ✓                          | ✓                          | -                                   |                         |
| HOPX          | ✗                               | ✓                               | -                          | ✓                          | ✓                                   | -                       |
| ITGB4         | ✗                               | ✗                               | -                          | -                          | ✗                                   | ✓                       |
| KLF4          | ✗                               | ✓                               | ✗                          | ✓                          | -                                   |                         |
| KLK7          | -                               | ✓                               | -                          | ✗                          | ✓                                   |                         |
| KLK11         | ✗                               | ✓                               | -                          | ✓                          | ✓                                   |                         |
| KRT1          | -                               | ✓                               | -                          | -                          | ✓                                   | ✗                       |
| KRT5          | ✗                               | -                               | -                          | ✓                          | ✓                                   | ✓                       |
| KRT10         | -                               | ✓                               | -                          | ✓                          | ✗                                   | -                       |

| GEN     | GDS2081<br>(Keratinocyten<br>1) | GDS1505<br>(Keratinocyten<br>2) | GDS1965<br>(Progression 1) | GDS1989<br>(Progression 2) | GDS1314<br>(Melanomzell-<br>linien) | GDS1761<br>(Spezifität) |
|---------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------------------------------|-------------------------|
| KRT14   | ✗                               | -                               | ✗                          | -                          | -                                   | ✓                       |
| KRT15   | ✗                               | -                               | -                          | ✓                          | -                                   | ✓                       |
| KRT23   |                                 | ✓                               | -                          | ✓                          | ✓                                   | -                       |
| LAMA3   | ✗                               | ✗                               | -                          | ✓                          | ✓                                   | ✓                       |
| LEPREL1 |                                 | ✗                               | ✗                          | ✗                          | ✗                                   |                         |
| LGALS7  | -                               | -                               | -                          | ✓                          | ✓                                   |                         |
| LOR     |                                 | ✓                               | -                          | -                          | ✓                                   |                         |
| LPAR1   | ✗                               | ✓                               | ✗                          | ✗                          | ✗                                   | ✓                       |
| LRIG1   | ✗                               | ✓                               | ✗                          | -                          | ✗                                   |                         |
| LRP4    | ✗                               | ✓                               | -                          | ✓                          | ✗                                   | -                       |
| LRRC1   |                                 | -                               | ✗                          | -                          | ✗                                   |                         |
| LY6D    | ✗                               | ✓                               | -                          | ✓                          | ✓                                   |                         |
| LYPD3   | ✗                               | ✓                               | -                          | ✓                          | ✓                                   |                         |
| MAOA    | ✗                               | ✗                               | ✗                          | ✓                          | ✗                                   | -                       |
| NDRG2   | ✓                               | ✓                               | ✗                          | ✓                          | ✓                                   | ✓                       |
| NEBL    | -                               | ✓                               | -                          | ✓                          | ✗                                   | ✓                       |
| NET1    | ✓                               | ✗                               | ✗                          | -                          | ✗                                   | ✓                       |
| NTRK2   | -                               | ✓                               | ✗                          | ✓                          | -                                   | -                       |
| P2RY14  | ✓                               | ✓                               | -                          | ✓                          | ✓                                   | ✗                       |
| PALMD   |                                 | ✓                               | -                          | ✓                          | ✓                                   | -                       |
| PBX1    | -                               | ✓                               | -                          | ✗                          | ✓                                   | ✓                       |
| PCDH21  | ✗                               | ✓                               | -                          | ✓                          | ✓                                   |                         |
| PDZD2   | ✗                               | ✓                               | -                          | ✓                          | ✗                                   | -                       |
| PHYHIP  | ✓                               | ✓                               | -                          | ✓                          | ✓                                   | -                       |
| PKP1    | ✗                               | -                               | -                          | ✓                          | ✓                                   | ✓                       |
| PLLP    | ✗                               | ✓                               | ✗                          | ✓                          | ✗                                   |                         |
| PPFIBP2 | ✗                               | ✓                               | ✗                          | -                          | ✗                                   |                         |
| PPL     | ✗                               | -                               | -                          | ✓                          | ✓                                   | ✓                       |
| PRSS3   | -                               | -                               | ✗                          | ✓                          | -                                   |                         |
| PTPN3   | ✗                               | -                               | ✗                          | -                          | ✗                                   |                         |
| PTPRF   | ✗                               | -                               | ✗                          | -                          | ✗                                   | ✓                       |
| RAB25   |                                 | -                               | -                          | ✓                          | ✓                                   | ✓                       |
| RBM35B  |                                 | -                               | -                          | ✓                          | ✓                                   | ✓                       |
| SCEL    | ✗                               | ✓                               | -                          | ✓                          | ✓                                   |                         |
| SCNN1A  | ✓                               | -                               | -                          | -                          | ✓                                   | ✓                       |
| SEPP1   | ✗                               | ✓                               | ✗                          | ✗                          | ✓                                   | ✗                       |
| SFN     | ✗                               | -                               | -                          | -                          | ✗                                   |                         |
| SLC38A1 |                                 | ✗                               | ✗                          | -                          | ✗                                   | ✓                       |
| SORBS2  | ✓                               | ✓                               | ✗                          | ✗                          | ✗                                   | ✗                       |
| SOSTDC1 | ✓                               | ✓                               | -                          | ✗                          | ✓                                   | -                       |
| SPARCL1 | ✓                               | ✓                               | ✗                          | ✗                          | ✗                                   | ✗                       |
| SPINK5  | -                               | ✓                               | -                          | -                          | ✓                                   |                         |
| SPINT1  | ✗                               | -                               | ✗                          | -                          | ✓                                   |                         |
| SRD5A1  | ✗                               | -                               | ✓                          | ✓                          | ✗                                   | -                       |
| TACSTD2 | ✗                               | -                               | -                          | -                          | ✓                                   | ✓                       |

| GEN     | GDS2081<br>(Keratinocyten<br>1) | GDS1505<br>(Keratinocyten<br>2) | GDS1965<br>(Progression 1) | GDS1989<br>(Progression 2) | GDS1314<br>(Melanomzell-<br>linien) | GDS1761<br>(Spezifität) |
|---------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------------------------------|-------------------------|
| TJP2    | ✗                               | ✗                               | ✗                          | -                          | ✗                                   | ✓                       |
| TPD52L1 | ✓                               | -                               | ✗                          | -                          | ✗                                   | ✓                       |
| TRIM29  | ✗                               | -                               | -                          | ✓                          | ✓                                   |                         |
| ZNF185  | ✗                               | -                               | -                          | -                          | -                                   |                         |
| ZNF750  |                                 | ✓                               | -                          | ✓                          | ✓                                   |                         |

**Tabelle 6:** Analyse der unterexprimierten Gene aus Tab. 4 anhand der *affymetrix arrays* GDS2081, GDS1505, GDS1965, GDS1989, GDS1314 und GDS1761

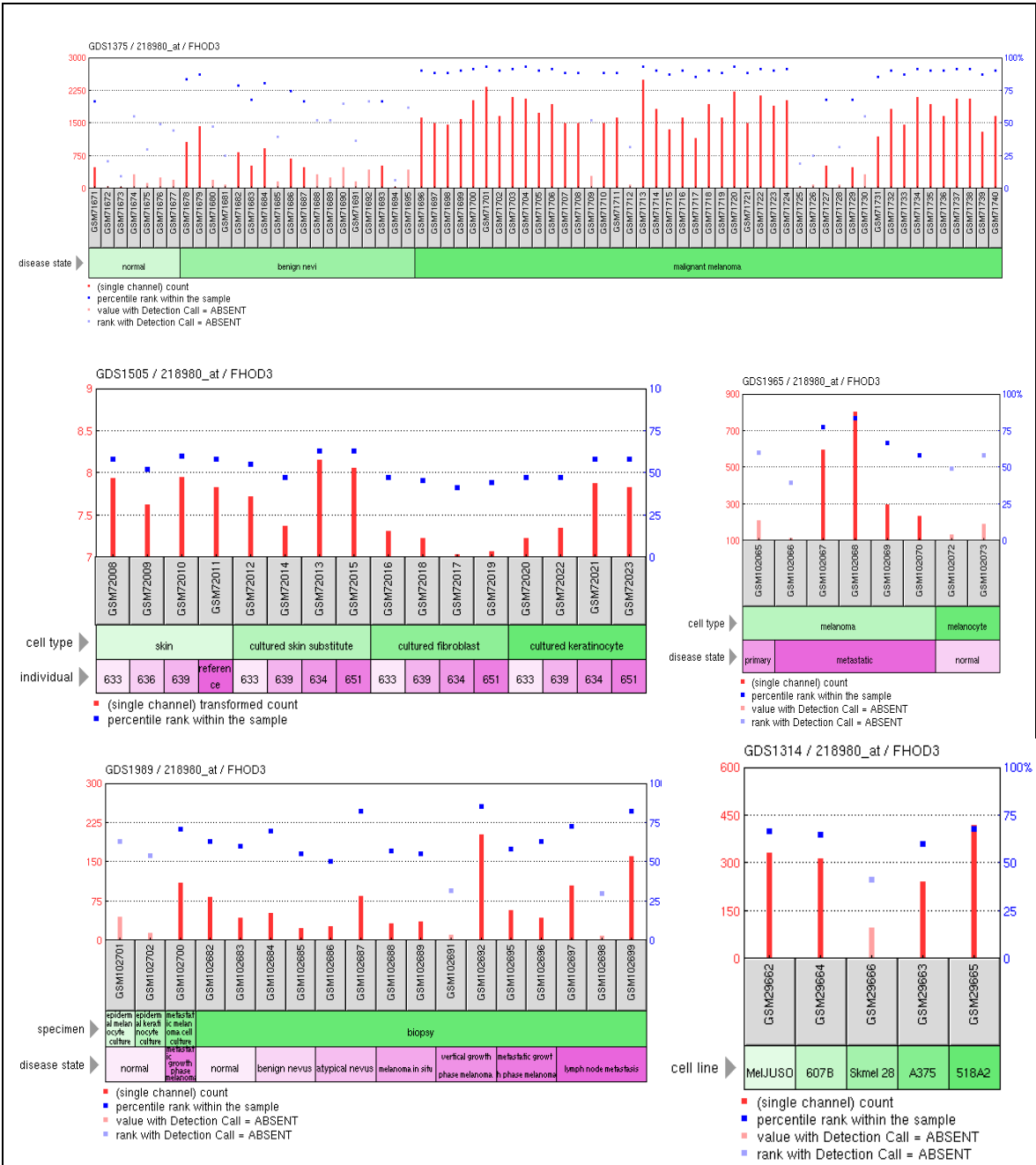
Anhand der genannten Kriterien wurden aus obiger Analyse (Tab. 5, Tab. 6) folgende Gene als überdurchschnittlich interessant ausgewählt (Endauswahl):

- ABHD2, AK2, ARNT2, BCL2A1, BE465032, BE568134, BUD31, C7orf49, CNIH3, COMMD4, CRIP2, CRYAB, CSGlca, DNAJB6, FAM134B, FGF1, FHOD3, FKBP10, HEY1, HSPH1, KIAA0265, LZTS1, NCAPG, PARN, PARP4, PEX6, PLOD1, SEMA3B, SILV, SPP1, TNFRSF21, TNPO3, TRIB2, U88968, W47179, ZNF274 (überexprimiert)
- ABHD9, AW129056, CFD, COBL, CSTA, CYP4F12, DSG1, EVPL, HIP1R, KLK11, KRT5, KRT23, LYPD3, P2RY14, PALMD, PCDH21, PHYHIP, PKP1, PPL, RAB25, RBM35B, SCEL, SCNN1A, ZNF750 (unterexprimiert)

Die obige Liste stellt weiterhin eine große Zahl an Genen dar, die allein aufgrund der *affymetrix arrays* als interessant zu bewerten sind. Zur weiteren Reduktion der Anzahl ist eine wichtige Überlegung die Unterscheidung zwischen *driver* und *passenger* Mutationen. *Driver* Mutationen sind Veränderungen der genetischen Information, die für die maligne Transformation der Zelle verantwortlich sind. Sie sind also, in unserem Fall, die Ursache für die Entstehung eines Melanoms. *Passenger* Mutationen dagegen werden Veränderungen genannt, die ebenfalls im Laufe der malignen Progression auftreten, jedoch keine Auswirkungen auf das Tumorwachstum haben. Die obige Liste wurde daher nach aktuellem Stand der Wissenschaft dahingehend analysiert, welche der Gene am ehesten solche *driver* Mutationen darstellen könnten. Darüber hinaus wurden auch wirtschaftliche Aspekte berücksichtigt sowie die Durchführbarkeit der experimentellen Analysen bei den einzelnen Genen. Diese Entscheidungen wurden im gemeinschaftlichen Konsens gefällt. Ausgewählt wurden die Gene FHOD3, TNFRSF21, HEY1 und COBL. Die

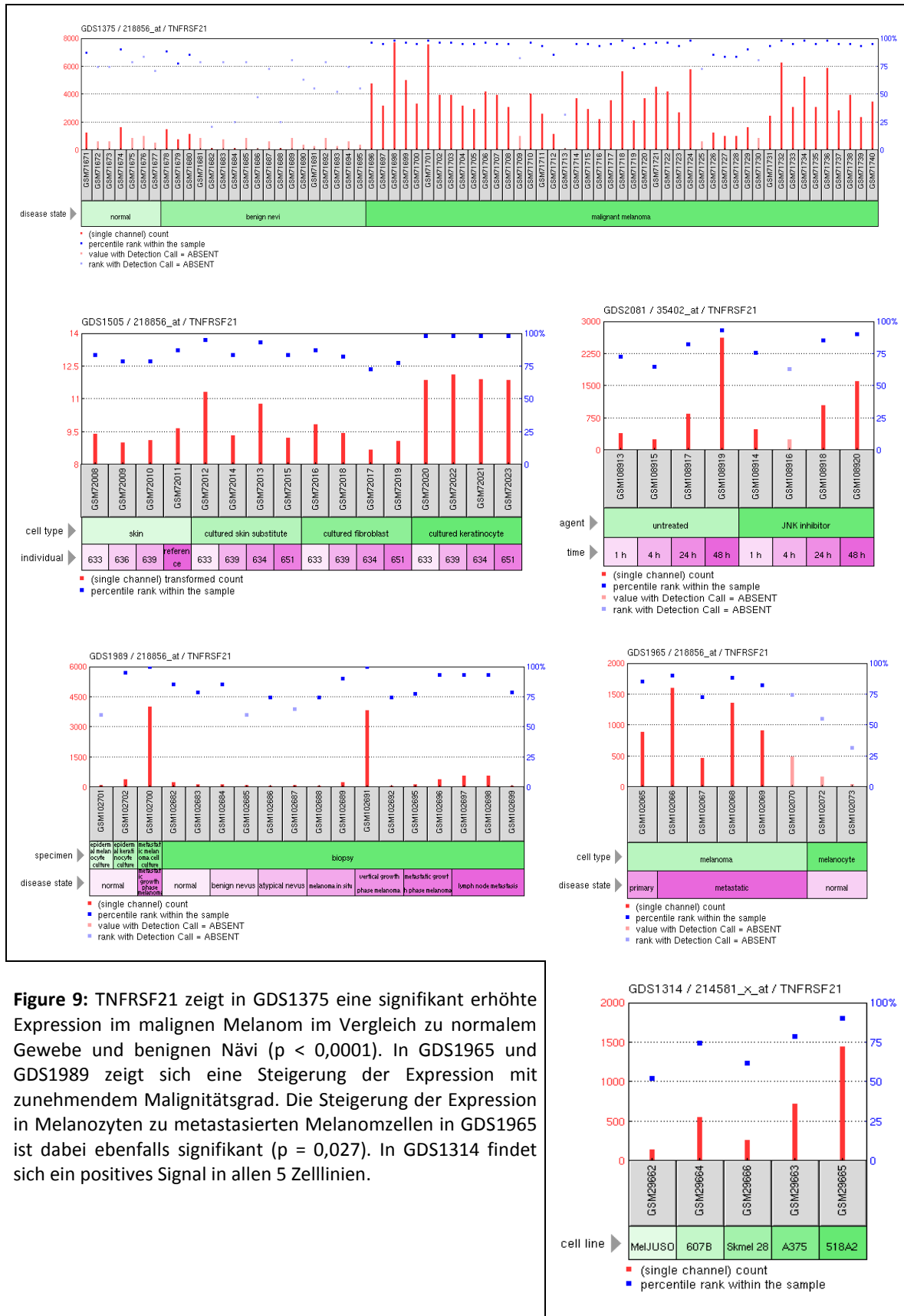
ersten drei Gene (Fig. 8, Fig. 9, Fig. 10) sind aus der Gruppe der überexprimierten Gene entnommen. Mit FHOD3, TNFRSF21 und HEY1 konnten hierbei jeweils Vertreter gefunden werden, deren Expression laut GDS1375 eine signifikante Steigerung im Laufe der malignen Transformation erfährt (Fig. 8, Fig. 9, Fig. 10). Auch die Ergebnisse in GDS1965 und GDS1989 zeigen, dass bei diesen drei Genen mit zunehmender Malignität der untersuchten Zellen eine Steigerung der Expression einhergeht (Fig. 8, Fig. 9, Fig. 10). Diese Ergebnisse sind teilweise ebenfalls statistisch signifikant. HEY1 ist der einzige Vertreter aller vier schlussendlich ausgewählten Kandidatengene, für den der GDS1761 durchgeführt worden ist. Dieser zeigt im Falle von HEY1 eine im Vergleich zu den anderen Tumorgeweben signifikante Erhöhung der Genexpression im malignen Melanom (Fig. 10). Das vierte Gen COBL wurde aus den Vertretern der unterexprimierten Gene ausgewählt. Das Ergebnis in GDS1375 zeigt ein signifikantes Abfallen der Expression im Zuge der malignen Entwicklung (Fig. 11). Oft ist in den *arrays* gar kein valides Signal detektierbar, wenn es sich bei der untersuchten Zelle um eine maligne transformierte Variante handelt. In GDS1989 zeigt sich eine mit steigender Malignität gleichermaßen abfallende Expression von COBL (Fig. 11).

- **FHOD3** – *formin homology 2 domain containing 3*, FHOS2, *formactin 2*



**Figure 8:** FHOD3 zeigt in GDS1375 eine signifikant erhöhte Expression im malignen Melanom im Vergleich zu normalem Gewebe und benignen Nävi ( $p < 0,0001$ ). In GDS1965 und GDS1989 zeigt sich eine Steigerung der Expression mit zunehmendem Malignitätsgrad. In GDS1314 findet sich ein positives Signal in 4 von 5 Zelllinien.

- **TNFRSF21** – tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21



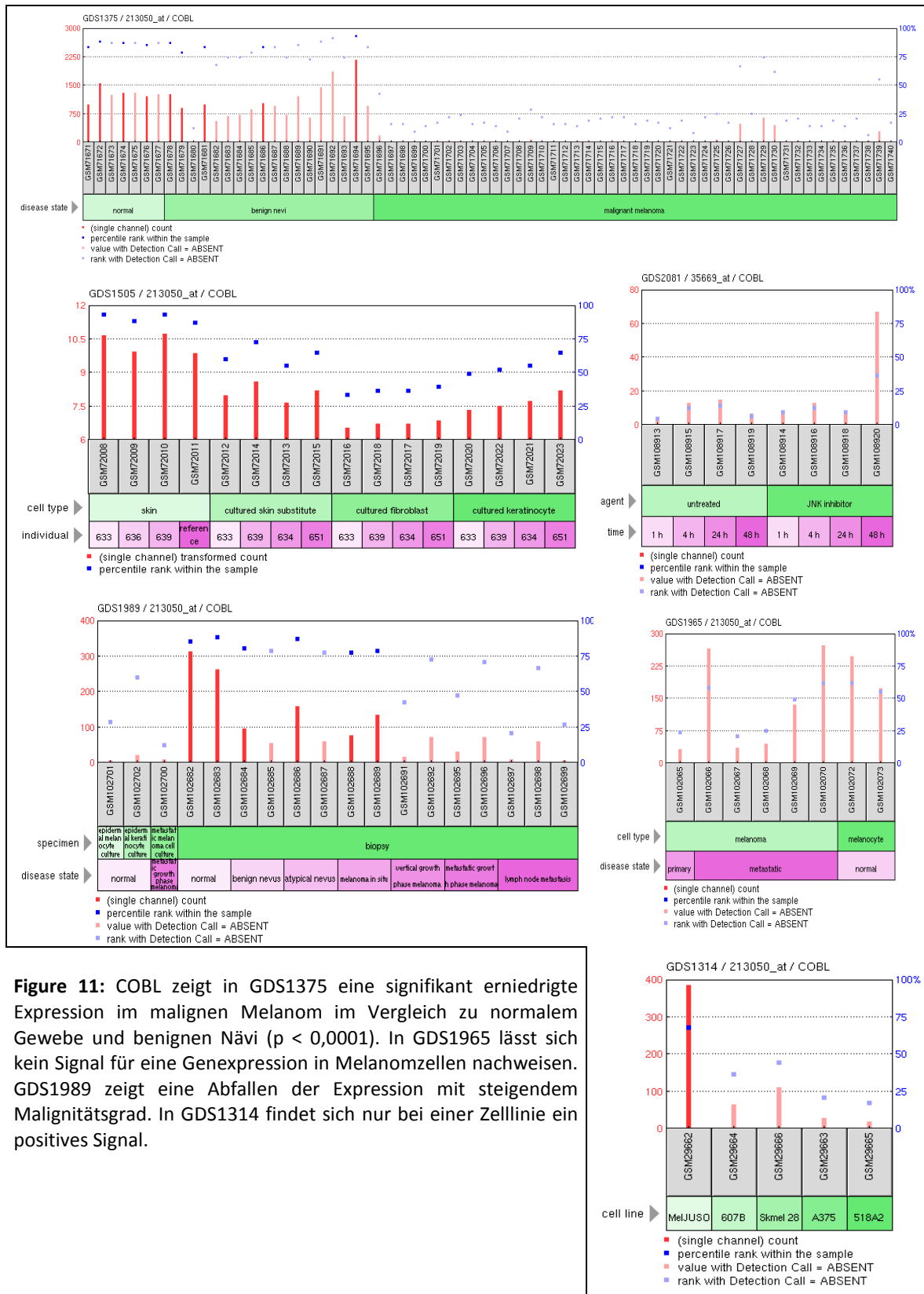
**Figure 9:** TNFRSF21 zeigt in GDS1375 eine signifikant erhöhte Expression im malignen Melanom im Vergleich zu normalem Gewebe und benignen Nävi ( $p < 0,0001$ ). In GDS1965 und GDS1989 zeigt sich eine Steigerung der Expression mit zunehmendem Malignitätsgrad. Die Steigerung der Expression in Melanozyten zu metastasierten Melanomzellen in GDS1965 ist dabei ebenfalls signifikant ( $p = 0,027$ ). In GDS1314 findet sich ein positives Signal in allen 5 Zelllinien.

- **HEY1** – *hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1*



**Figure 10:** HEY1 zeigt in GDS1375 eine signifikant erhöhte Expression im malignen Melanom im Vergleich zu normalem Gewebe und benignen Nävi ( $p < 0,0001$ ). In GDS1965 und GDS1989 zeigt sich eine Steigerung der Expression mit zunehmendem Malignitätsgrad. In GDS1314 findet sich ein positives Signal in allen 5 Zelllinien. Außerdem weist GDS1761 auf eine für das Melanom spezifische Regulierung hin, da die Expression im Vergleich zu den anderen untersuchten Tumorgeweben im Melanom signifikant erhöht ist ( $p = 0,0063$ ).

- **COBL – Cordon bleu homologue (mouse)**



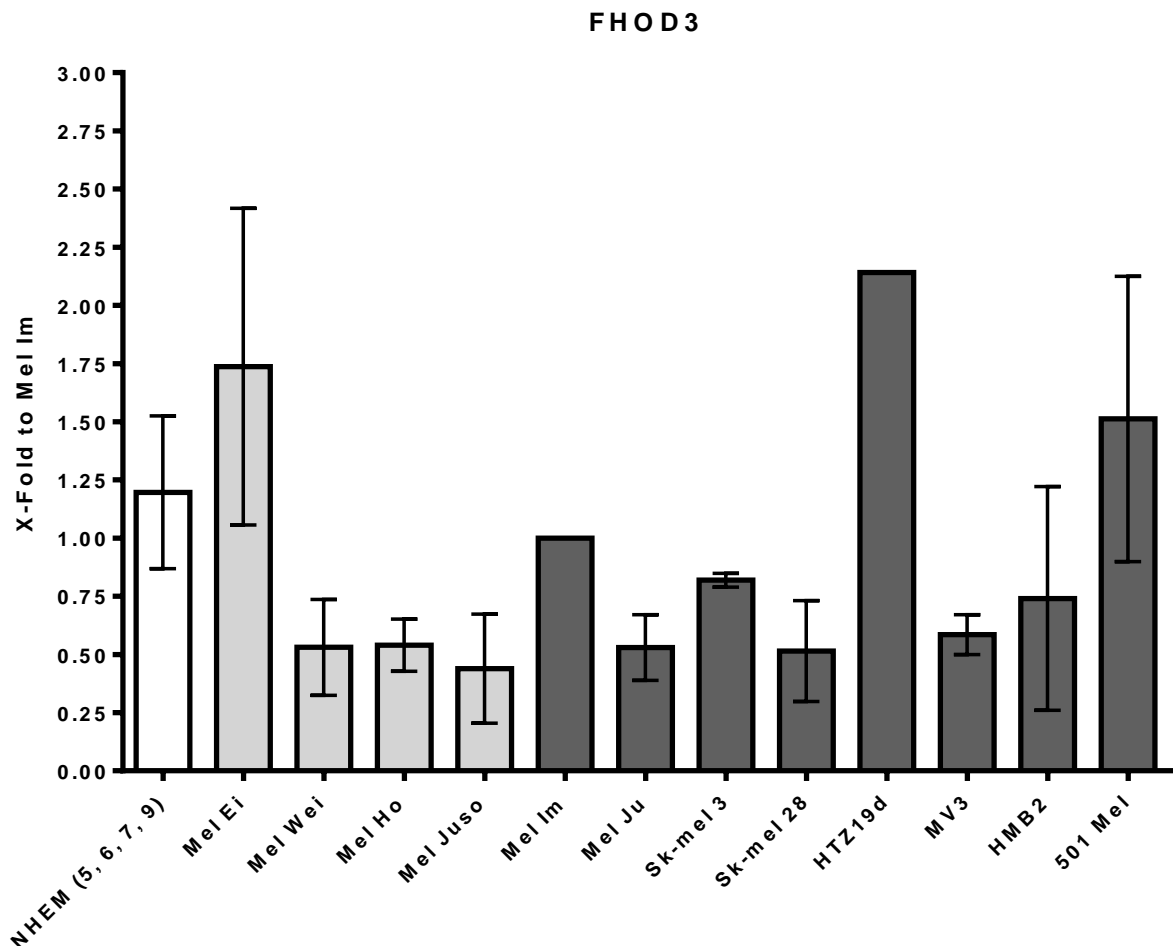
**Figure 11:** COBL zeigt in GDS1375 eine signifikant erniedrigte Expression im malignen Melanom im Vergleich zu normalem Gewebe und benignen Nävi ( $p < 0,0001$ ). In GDS1965 lässt sich kein Signal für eine Genexpression in Melanomzellen nachweisen. GDS1989 zeigt eine Abfall der Expression mit steigendem Malignitätsgrad. In GDS1314 findet sich nur bei einer Zelllinie ein positives Signal.



### 3.2 Ergebnisse der quantitativen *real time* PCR

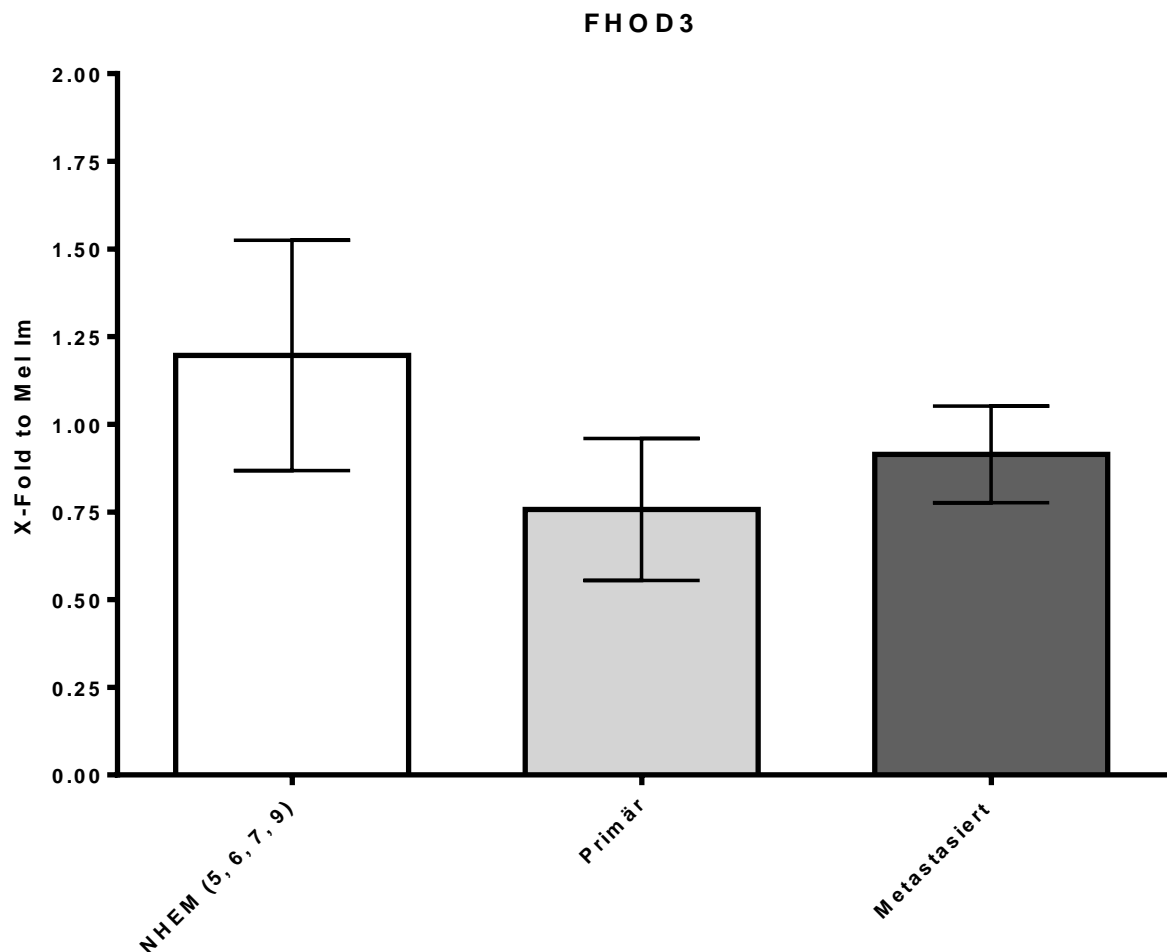
Zu Beginn der experimentellen Untersuchungen zeigte sich, dass für COBL leider kein geeignetes Primerpaar gefunden werden konnte, so dass dieses Gen aus dem weiteren Prozess ausgeschlossen wurde. Bei den anderen Genen zeigten sich hier keine Probleme, so dass folgende graphisch dargestellten Expressionsmuster erstellt werden konnten (Fig. 12, Fig. 14 und Fig. 16).

- **FHOD3** – *formin homology 2 domain containing 3, FHOS2, formactin 2*



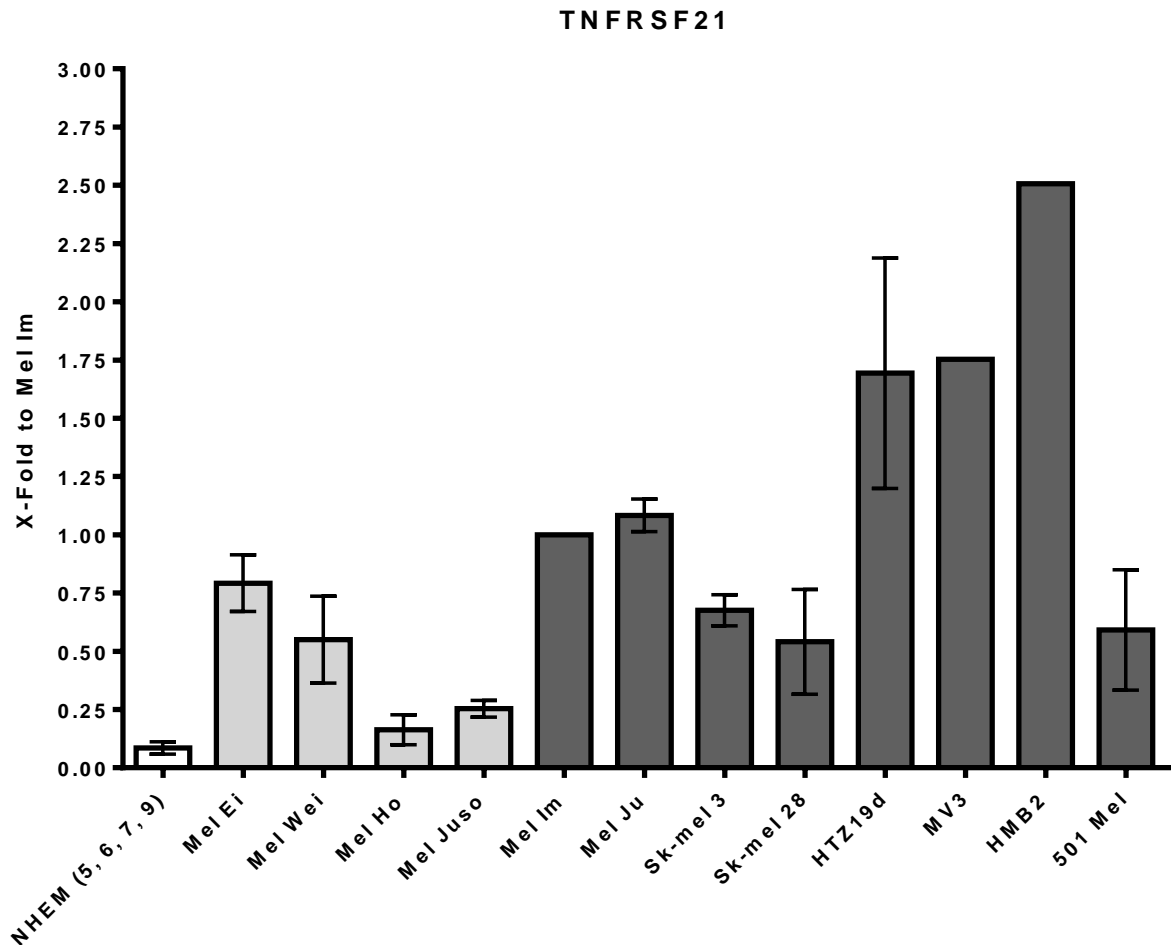
**Figure 12:** Darstellung der Expression von FHOD3, ermittelt durch quantitative *real time* PCR. Der weiße Balken zeigt zusammengefasst die Expression in den Melanozytenzelllinien (*normal human epidermal melanocytes*). Es handelt sich um die Passagen 5, 6, 7 und 9. Die hellgrauen Balken zeigen die Expression in den primären Melanomzelllinien Mel Ei, Mel Wei, Mel Ho und Mel Juso. Die dunkelgrauen Balken zeigen die Expression in den metastasierten Melanomzelllinien Mel Im, Mel Ju, Sk-mel 3, Sk-mel 28, HTZ19d, MV3, HMB2 und 501 Mel. Die T-Linien symbolisieren die Abweichungen der Einzelmessungen vom errechneten Mittelwert. Die Expressionsstärke in der Zelllinie Mel Im wurde als Bezugspunkt auf den Wert 1 festgesetzt. Alle weiteren Werte stellen ein Vielfaches der ermittelten Expression in den Mel Im Zellen dar.

Die gemessenen Unterschiede hinsichtlich der Expressionsstärke von FHOD3 in den verschiedenen Zelllinien sind nicht signifikant. Die Graphik zeigt, dass die Expression von FHOD3 über die verschiedenen Stadien der malignen Entwicklung weitestgehend konstant zu bleiben scheint. Zur weiteren Illustration der Verhältnisse der Stadien zueinander dient Fig 13.



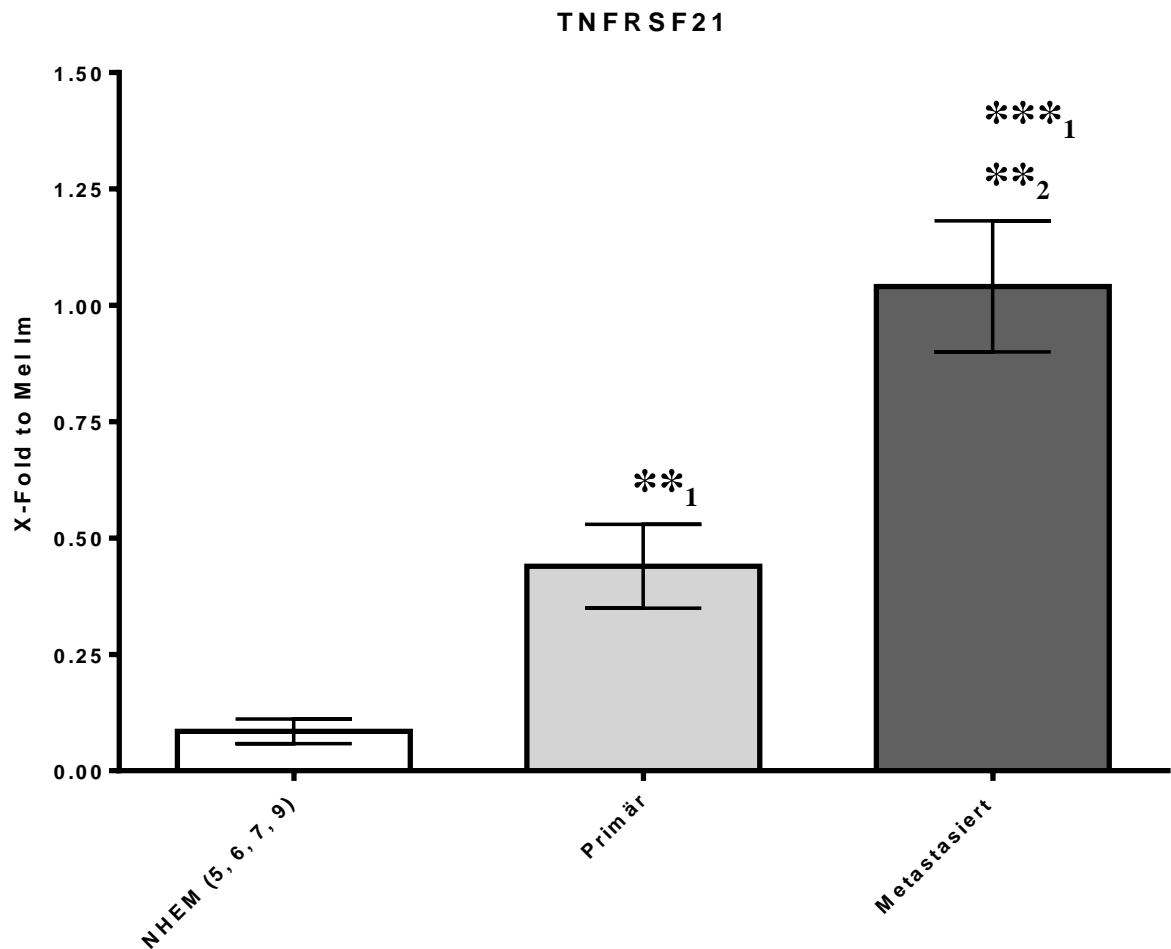
**Figure 13:** Darstellung der Expression von FHOD3, ermittelt durch quantitative *real time* PCR. Der weiße Balken zeigt zusammengefasst die Expression in den Melanozytenzelllinien (*normal human epidermal melanocytes*). Es handelt sich um die Passagen 5, 6, 7 und 9. Der hellgraue Balken zeigt zusammengefasst die Expression in den primären Melanomzelllinien Mel Ei, Mel Wei, Mel Ho und Mel Juso. Der dunkelgraue Balken zeigt zusammengefasst die Expression in den metastasierten Melanomzelllinien Mel Im, Mel Ju, Sk-mel 3, Sk-mel 28, HTZ19d, MV3, HMB2 und 501 Mel. Die T-Linien symbolisieren die Abweichungen der Einzelmessungen vom errechneten Mittelwert. Die Expressionsstärke in der Zelllinie Mel Im wurde als Bezugspunkt auf den Wert 1 festgesetzt. Alle weiteren Werte stellen ein Vielfaches der ermittelten Expression in den Mel Im Zellen dar.

- **TNFRSF21** – *tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21*



**Figure 14:** Darstellung der Expression von TNFRSF21, ermittelt durch quantitative *real time* PCR. Der weiße Balken zeigt zusammengefasst die Expression in den Melanozytenzelllinien (*normal human epidermal melanocytes*). Es handelt sich um die Passagen 5, 6, 7 und 9. Die hellgrauen Balken zeigen die Expression in den primären Melanomzelllinien Mel Ei, Mel Wei, Mel Ho und Mel Juso. Die dunkelgrauen Balken zeigen die Expression in den metastasierten Melanomzelllinien Mel Im, Mel Ju, Sk-mel 3, Sk-mel 28, HTZ19d, MV3, HMB2 und 501 Mel. Die T-Linien symbolisieren die Abweichungen der Einzelmessungen vom errechneten Mittelwert. Die Expressionsstärke in der Zelllinie Mel Im wurde als Bezugspunkt auf den Wert 1 festgesetzt. Alle weiteren Werte stellen ein Vielfaches der ermittelten Expression in den Mel Im Zellen dar.

Bei TNFRSF21 zeigen die Ergebnisse deutlich signifikante Unterschiede hinsichtlich der Expression in den verschiedenen Zelllinien. Der Anstieg der Expression von den benignen Melanozyten (NHEM) zu den primären Melanomzelllinien ist ebenso signifikant ( $p = 0,0061$ ) wie der zu den metastasierten ( $p < 0,0001$ ). Auch der weitere Anstieg von den primären zu den metastasierten Zelllinien erfüllt diese Kriterien ( $p = 0,001$ ). Die Verhältnisse der verschiedenen Stadien werden durch die folgende Graphik (Fig. 15) noch einmal deutlich herausgestellt.



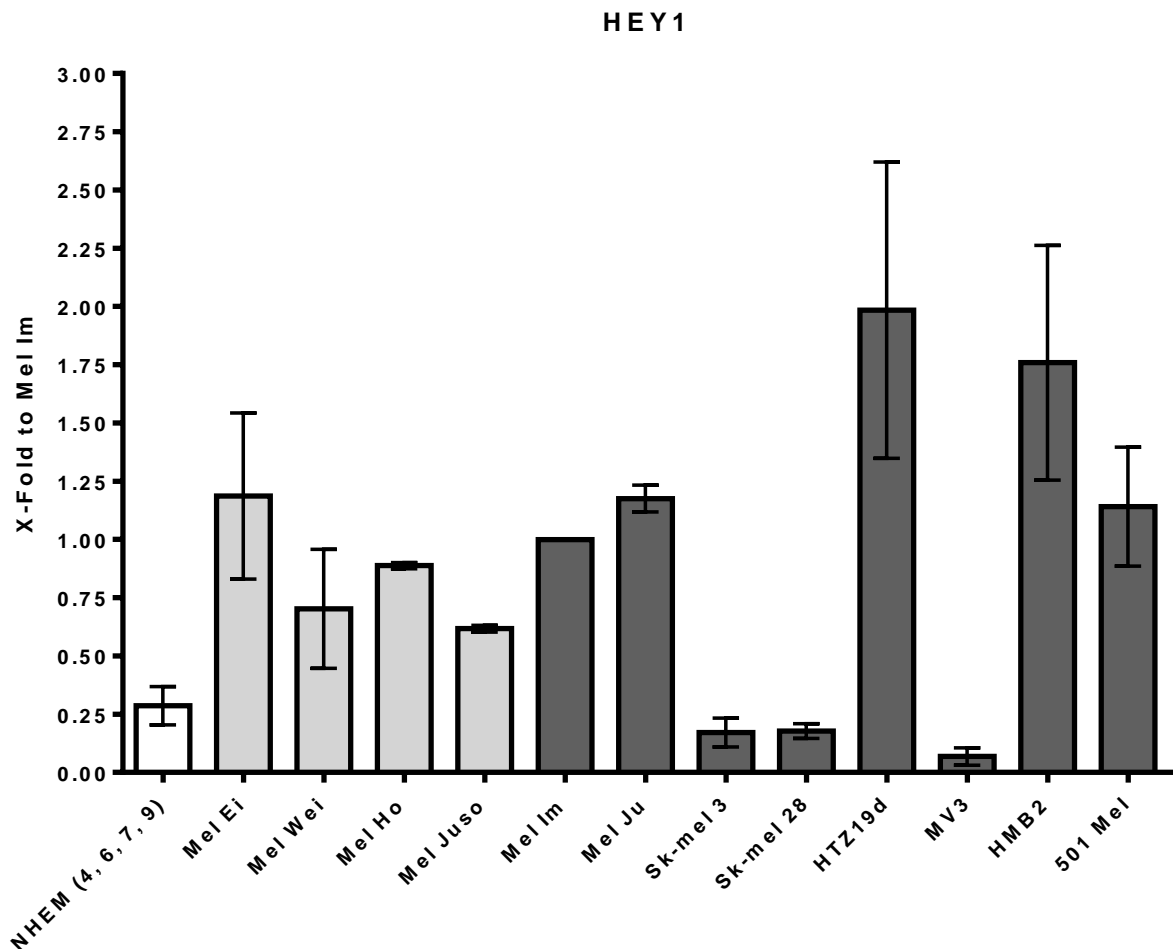
**Figure 15:** Darstellung der Expression von TNFRSF21, ermittelt durch quantitative *Real-time* PCR. Der weiße Balken zeigt zusammengefasst die Expression in den Melanozytenzelllinien (*neo-natal normal human epidermal melanocytes*). Es handelt sich um die Passagen 5, 6, 7 und 9. Der hellgraue Balken zeigt zusammengefasst die Expression in den primären Melanomzelllinien Mel Ei, Mel Wei, Mel Ho und Mel Juso. Der dunkelgraue Balken zeigt zusammengefasst die Expression in den metastasierten Melanomzelllinien Mel Im, Mel Ju, Sk-mel 3, Sk-mel 28, HTZ19d, MV3, HMB2 und 501 Mel. Die T-Linien symbolisieren die Abweichungen der Einzelmessungen vom errechneten Mittelwert. Die Expressionsstärke in der Zelllinie Mel Im wurde als Bezugspunkt auf den Wert 1 festgesetzt. Alle weiteren Werte stellen ein Vielfaches der ermittelten Expression in den Mel Im Zellen dar.

\*\*1 = signifikanter Unterschied in der Expression zwischen Primär und NHEM ( $p = 0,0061$ )

\*\*2 = signifikanter Unterschied in der Expression zwischen Metastasiert und Primär ( $p = 0,001$ )

\*\*\* = signifikanter Unterschied in der Expression zwischen Metastasiert und NHEM ( $p < 0,0001$ )

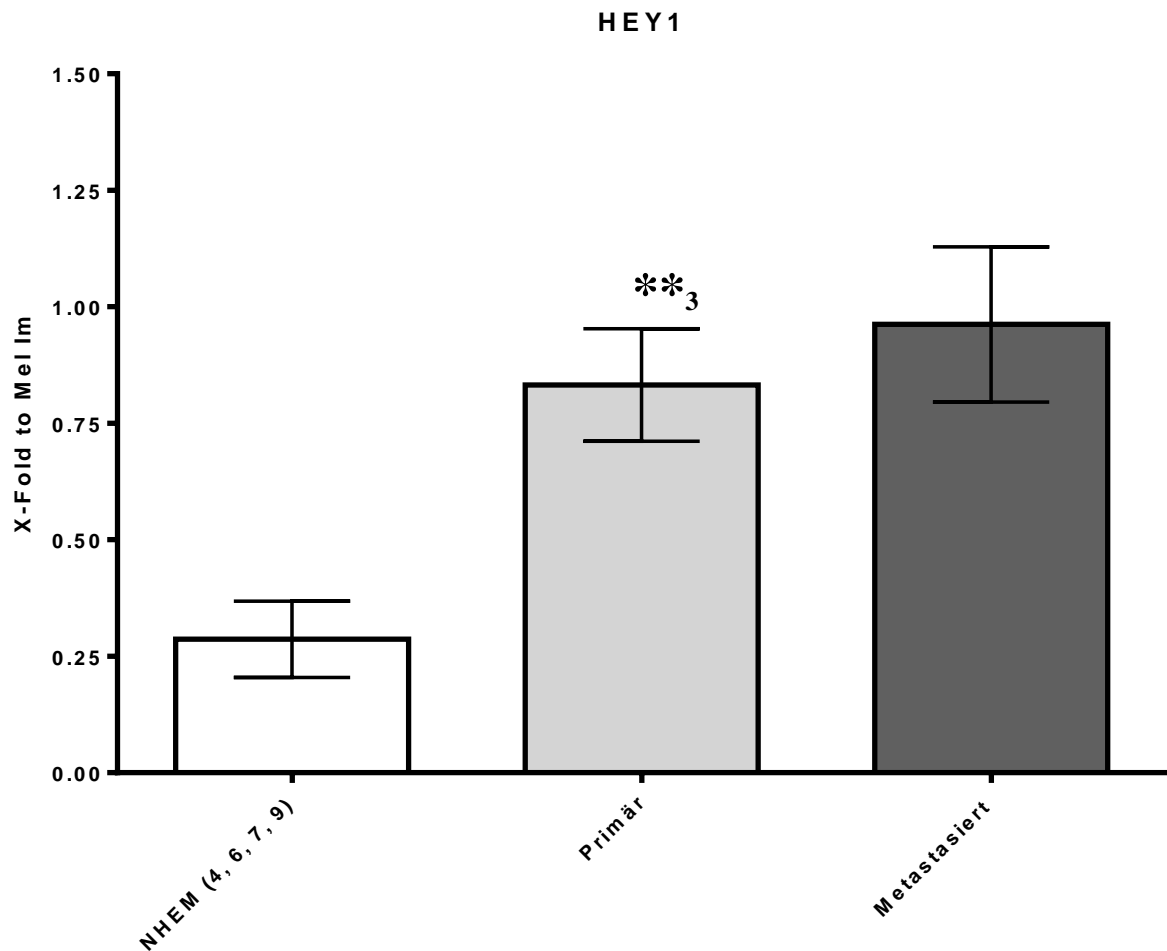
- **HEY1** – *hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1*



**Figure 16:** Darstellung der Expression von HEY1, ermittelt durch quantitative *real time* PCR. Der weiße Balken zeigt zusammengefasst die Expression in den Melanozytenzelllinien (*normal human epidermal melanocytes*). Es handelt sich um die Passagen 4, 6, 7 und 9. Die hellgrauen Balken zeigen die Expression in den primären Melanomzelllinien Mel Ei, Mel Wei, Mel Ho und Mel Juso. Die dunkelgrauen Balken zeigen die Expression in den metastasierten Melanomzelllinien Mel Im, Mel Ju, Sk-mel 3, Sk-mel 28, HTZ19d, MV3, HMB2 und 501 Mel. Die T-Linien symbolisieren die Abweichungen der Einzelmessungen vom errechneten Mittelwert. Die Expressionsstärke in der Zelllinie Mel Im wurde als Bezugspunkt auf den Wert 1 festgesetzt. Alle weiteren Werte stellen ein Vielfaches der ermittelten Expression in den Mel Im Zellen dar.

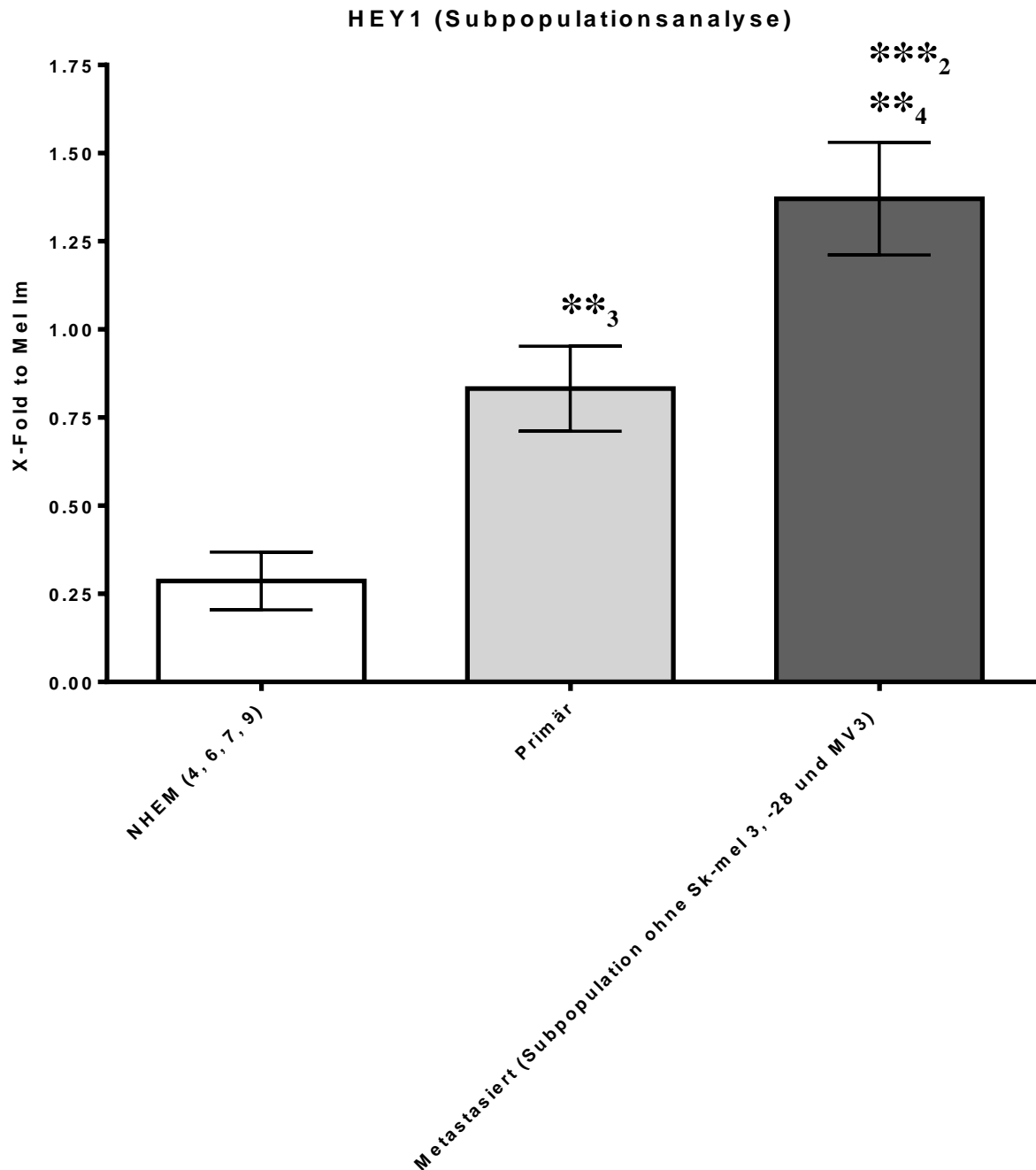
Bei HEY1 zeigt sich in den primären Melanomzelllinien ein signifikanter ( $p = 0,007$ ) Anstieg der Expression im Vergleich mit den Melanozytenzelllinien (NHEM). Die Veränderung der Expression in den metastasierten Melanomzelllinien ist jeweils nicht signifikant, wenn in die Berechnung alle metastasierten Vertreter mit einbezogen werden. Die Graphik suggeriert jedoch die Existenz von verschiedenen Subpopulationen mit einem unterschiedlichen Expressionsprofil hinsichtlich HEY1. Werden die Zelllinien Sk-mel 3, Sk-mel 28 und MV3 ausgeschlossen, zeigt sich auch eine signifikante Steigerung der

Expression von HEY1 zu den metastasierten Melanomzelllinien ( $p = 0,0002$  beim Vergleich mit den Melanozyten bzw.  $p = 0,0085$  beim Vergleich mit den primären Melanomzellen). Auch dieser Zusammenhang wird in den folgenden Graphen noch einmal zusammengefasst (Fig. 17, Fig. 18).



**Figure 17:** Darstellung der Expression von HEY1, ermittelt durch quantitative *real time* PCR. Der weiße Balken zeigt zusammengefasst die Expression in den Melanozytenzelllinien (*normal human epidermal melanocytes*). Es handelt sich um die Passagen 4, 6, 7 und 9. Der hellgraue Balken zeigt zusammengefasst die Expression in den primären Melanomzelllinien Mel Ei, Mel Wei, Mel Ho und Mel Juso. Der dunkelgraue Balken zeigt zusammengefasst die Expression in den metastasierten Melanomzelllinien Mel Im, Mel Ju, Sk-mel 3, Sk-mel 28, HTZ19d, MV3, HMB2 und 501 Mel. Die T-Linien symbolisieren die Abweichungen der Einzelmessungen vom errechneten Mittelwert. Die Expressionsstärke in der Zelllinie Mel Im wurde als Bezugspunkt auf den Wert 1 festgesetzt. Alle weiteren Werte stellen ein Vielfaches der ermittelten Expression in den Mel Im Zellen dar.

\*\*3= signifikanter Unterschied in der Expression zwischen Primär und NHEM ( $p = 0,007$ )



**Figure 18:** Darstellung der Expression von HEY1, ermittelt durch quantitative *real time* PCR. Der weiße Balken zeigt zusammengefasst die Expression in den Melanozytenzelllinien (*normal human epidermal melanocytes*). Es handelt sich um die Passagen 4, 6, 7 und 9. Der hellgraue Balken zeigt zusammengefasst die Expression in den primären Melanomzelllinien Mel Ei, Mel Wei, Mel Ho und Mel Juso. Der dunkelgraue Balken zeigt zusammengefasst die Expression in den metastasierten Melanomzelllinien Mel Im, Mel Ju, HTZ19d, HMB2 und 501 Mel. Die T-Linien symbolisieren die Abweichungen der Einzelmessungen vom errechneten Mittelwert. Die Expressionsstärke in der Zelllinie Mel Im wurde als Bezugspunkt auf den Wert 1 festgesetzt. Alle weiteren Werte stellen ein Vielfaches der ermittelten Expression in den Mel Im Zellen dar.

\*\*3 = signifikanter Unterschied in der Expression zwischen Primär und NHEM ( $p = 0,007$ )

\*\*4 = signifikanter Unterschied in der Expression zwischen Primär und NHEM ( $p = 0,0085$ )

\*\*\*2 = signifikanter Unterschied in der Expression zwischen Metastasiert (Subpop.) und NHEM ( $p = 0,0002$ )

## 4 Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden mehrere Ziele verfolgt. Zu Beginn wurde in der Online-Datenbank des NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) nach Genen gesucht, die in der Entwicklung des malignen Melnoms eine wichtige Rolle zu spielen scheinen. Dies geschah durch die Analyse verschiedener *affymetrix arrays* der Untergruppe *GEO Profiles*. Auf diese Art und Weise wurden die Gene FHOD3, TNFRSF21, HEY1 und COBL als interessant für die weiteren Analysen ermittelt.

Im Folgenden wurde die quantitative *real time* PCR Technik (Light Cycler) zur Überprüfung dieser Ergebnisse eingesetzt. Es wurde experimentell untersucht, inwieweit und wie stark diese Gene in Melanozyten, primären Melanomzellen und metastasierten Melanomzellen exprimiert werden. Hierzu dienten repräsentativ für die verschiedenen Stadien der malignen Entwicklung des Melanoms ausgesuchte Zelllinien. Hierbei konnten die ursprünglich mit den *affymetrix arrays* gefundenen Zusammenhänge und Ergebnisse zum Teil bestätigt werden.

Ein letzter Punkt bezieht sich auf die Herangehensweise zu dieser Arbeit generell. Es stellt sich die Frage ob, wie hier vorgeführt, eine solche Datenbank als verlässlicher Ausgangspunkt für experimentelle Fragestellungen verwendet werden kann.

### **4.1 FHOD3 - *formin homology 2 domain containing 3*, FHOS2, formactin 2**

#### **4.1.1 Die Familie der *formin homology* Proteine**

Das Gen FHOD3 wurde erstmals 2004 von Katoh et al. beschrieben. Es ist auch unter dem Synonym FHOS2 bekannt. Es liegt auf dem Genlokus 18q12.2 und besteht aus über 25 Exons. Die Gensequenz zeigte sich homolog zum schon länger bekannten FHOD1. Durch alternatives *Splicing* vom *exon-skipping* Typ werden daraus jedoch mehrere Isoformen des Proteins hergestellt, die alle zur Familie der *formin homology* Proteine gehören. Diese Proteine stehen als Regulationsfaktoren im Zusammenhang mit dem Aufbau des Aktinzytoskeletts und dessen Stabilität. Prozesse, die damit in Beziehung stehen, sind Organogenese, Gewebekomöostase, jedoch gleichzeitig die Invasion bzw. die Invasivität



von malignen Zellen. Die Bindung an die Aktinfilamentmonomere wird dabei über die FH (*formin homology*) Domänen 1 und 2 der *formin homology* Proteine geschlossen. Andere Vertreter dieser Familie sind FHOD1/FHOS1, GRID2IP, Fmn1 und Fmn2, die als *non-FDD-type formin homology* Proteine bezeichnet werden. FMNL1, FMNL2/FHOD2, FMNL3, DAAM1, DAAM2, DIAPH1, DIAPH2 und DIAPH3/mDia2 dagegen sind *FDD-type formin homology* Proteine (Katoh et al., 2004).

#### 4.1.2 Spezifische Eigenheiten von FHOD3

Bei der Expression von FHOD3 zeigt sich eine Prädominanz in Zellen des humanen Myokards, der Nieren und des Gehirns. Das sonst beinahe ubiquitär exprimierte FHOD1 findet sich dabei in Herzmuskelgewebe nur sehr gering verbreitet, im Gehirn überhaupt nicht. Für die verschiedenen *Splice* Varianten von FHOD3 liegt eine weitere Organspezifität vor. Die Myokardvariante ist länger (FHOD3L, *long*), während in Gehirn und Niere vorrangig eine kürzere Form exprimiert wird (FHOD3S, *short*). Kanaya et al. beobachteten, dass eine Überexpression von FHOD3 die Bildung von Aktin-Stress-Filamenten und damit Zellelongation induziert. Dies stellt einen organisierenden Einfluss auf die Filamente dar. Daraus schloss man, dass auch FHOD3 eine zytoskelettale Organisatorfunktion erfüllt. In diesen Punkten ähnelt FHOD3 stark FHOD1, welches schon besser erforscht ist und diese Funktion in den anderen Geweben zu übernehmen scheint. Neuere Untersuchungen zeigen, dass FHOD3 im Herzmuskel in zwei eng aneinander liegenden Banden im Bereich der M-Linie der Sarkomere zu finden ist. Unterschiede zwischen embryonalem und adultem Gewebe ließen sich dabei nicht nachweisen. Das lässt vermuten, dass hier auch die Organisation ganzer Sarkomere, spezifisch die Mikroarchitektur der Aktin- und Myosinfilamente, die Kontrolle oder Unterstützung von FHOD3 benötigt (Kan-o et al., 2012).

#### 4.1.3 FHOD3 in der Tumor- und Melanomentstehung

Die aus den Datenbanken des NCBI entnommenen Graphen zeigen deutlich eine signifikante Steigerung der Expression von FHOD3 in Melanomzellen im Vergleich zu benignen Pigmentzellen (siehe GDS1375 in Fig. 8). Hierbei wird auch deutlich, dass die Expression mit zunehmender Malignität der Zellen weiter ansteigt (siehe GDS1965/GDS1989 in Fig. 8). Im Rahmen der experimentellen Analysen konnte jedoch

keine signifikante Veränderung der mRNA-Expression von FHOD3 nachgewiesen werden (Fig. 12, Fig. 13). Im Rahmen der malignen Progression von normalen Melanozyten, repräsentiert durch die NHEM (*normal human epidermal melanocytes*), zu den primären Tumorzelllinien (Mel Ei, Mel Wei, Mel Ho und Mel Juso) zeigte sich keine signifikante Steigerung der Expression. Auch im weiteren Verlauf der Progression hin zu den metastasierten Melanomzelllinien (Mel Im, Mel Ju, Sk mel 3, Sk mel 28, HTZ19d, MV3, HMB2 und 501 Mel) konnte keine signifikante Zunahme der Genexpression ermittelt werden. Da sich damit die Ergebnisse der Datenbank und die experimentell ermittelten Daten widersprechen, bleibt die Rolle von FHOD3 im Rahmen der Melanomentstehung weiterhin unklar. Weitere Untersuchungen sind daher nötig, den Einfluss von *formin homology* Proteinen auf die maligne Progression der Melanozyten zu untersuchen.

Interessant ist hinsichtlich der fraglichen Rolle von FHOD3 bei der Melanomentstehung auch, dass FHOD3 weitreichendere und übergeordnetere Funktionen beim Auf- und Umbau der zytoskelettalen Bestandteile zu haben scheint. Diese scheinen über die Organisatorfunktion im Bereich der Aktinmikrofilamente hinaus zu gehen, da sich FHOD3 auch im Bereich der Intermediärfilamente anreichert. Nachgewiesen wurde hier die Assoziation mit dem Intermediärfilament Nestin. Dieses findet sich lediglich in Stammzellen (vornehmlich der Neuro- und Myogenese), nicht jedoch in weiter differenzierten Zellen (Kanaya et al., 2005). Bekanntermaßen sind die drei Hauptbestandteile des humanen Zytoskeletts (Aktin Mikrofilamente, Mikrotubuli und Intermediärfilamente) nicht in der Lage, direkt aneinander zu binden. Die Arbeiten von Kanaya et al. zeigten, dass FHOD3 einer der Bausteine sein könnte, die für die Interaktion und Verbindung der zytoskelettalen Bestandteile untereinander verantwortlich sind. Vor allem die Interaktion von Aktin-Mikrofilamenten und Intermediärfilamenten scheint durch FHOD3 mitvermittelt. Assoziationen zu den Mikrotubulikomponenten des Zytoskeletts konnten jedoch nicht nachgewiesen werden. Auch wurde bisher lediglich eine Co-Lokalisation mit dem Intermediärfilament Nestin gefunden. (Kanaya et al., 2005). Abgesehen von der Assoziation mit Nestin könnte FHOD3 aber denkbar auch in adulten Zellen in der Lage sein, als Mediator der Interaktion von Aktin- und Intermediärfilamenten zu fungieren.

Weiterhin ist FHOD3 in neuroepithelialen Zellen nachgewiesen worden (fetales Gehirn- und Nebennierengewebe der Ratte). Auch hier war es vorwiegend im Bereich der Nestin Intermediärfilamente lokalisiert. Wie schon ausgeführt, sind auch Melanozyten ursprünglich neuroektodermalen Ursprungs. Sie entstammen der Neuralleiste und dringen von dort im Rahmen der embryonalen Entwicklung erst in die Epidermis vor. Die Tatsache, dass FHOD3 in den neuroepithelialen Zellen nachgewiesen wurde, könnte ein Hinweis darauf sein, dass auch in Melanoblasten eine solche Expression vorliegt.

Untersuchungen über eine Bedeutung der *formin homology* Proteine im Rahmen der malignen Transformation von Zellen oder gar einer speziellen Rolle bei der Melanomentstehung gibt es nicht. Interessant ist aber, dass Vertreter der *formin homology* Proteine essenziell für die Ausbildung von Filopodien sind (Harris et al., 2010). Namentlich wurden hierbei bisher mDia2, FRL1/FMNL1 und FRL2/FMNL3 untersucht. Mit unterschiedlichen Hauptfunktionen wurde hierbei deutlich, dass sowohl die Konstruktion, wie auch die Funktion der Filopodien von intakten Vertretern dieser Proteinfamilie abhängt. Eine wesentliche Aufgabe von Filopodien im menschlichen Körper ist die Mobilisierung von Zellen im Rahmen der embryonalen Entwicklung. Die Ausbildung von mobilen Zellfortsätzen ermöglicht es verschiedenen Stammzellen, auf amöboide Art die Gebiete des Organismus zu erreichen, an denen die endgültige Differenzierung stattfindet. Auch für Melanoblasten wurde nachgewiesen, dass sie eine derartige Bildung von Filopodien zeigen um sich fortzubewegen (Li et al., 2012). Dies legt verschiedene Vermutungen im Bezug auf das maligne Melanom nahe. Bestens bekannt ist die, auch im Vergleich zu anderen malignen Tumoren, hohe Neigung zu invasivem Wachstum und Metastasenbildung bei Melanomen. Die Fortbewegung mittels der Ausbildung von Filopodien ist eine Möglichkeit, derer sich maligne transformierte Melanozyten bedienen könnten. Dies wird eben dadurch gestützt, dass diese Art der Fortbewegung schon von den Vorläufern der Pigmentzellen genutzt wird, um von der Neuralleiste zur Epidermis zu gelangen. Auch von Li et al. wird auf Grund der aktuellen Beobachtungen der Fortbewegung von Melanoblasten vermutet, dass die Reaktivierung dieser embryonalen Programme eine wichtige Rolle bei der Melanomprogression spielt. Inwieweit nun FHOD3 als möglicher Co-Faktor dieser Prozesse involviert sein könnte, bleibt vorerst ungeklärt.

Im Sinne des biochemischen Zusammenhangs jedoch, könnte eine höhere Expression von FHOD3 in Melanomzellen dadurch erklärt werden.

## **4.2 TNFRSF21 - tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21**

### **4.2.1 Die Apoptose als Hauptaufgabe von TNFRSF21**

TNFRSF21 gehört zur Familie der Tumornekrosefaktorrezeptoren. Synonym ist er auch als Todesrezeptor 6 (*death receptor 6*, DR6) bekannt. Diese Rezeptoren sind membranständige Proteine, die mit einer sogenannten Todesdomäne ausgestattet sind. Durch die Bindung mit den entsprechenden Liganden wird von diesen Rezeptoren intrazellulär der programmierte Zelltod, die Apoptose, ausgelöst. Interessant ist, dass die durch TNFRSF21 induzierte Apoptose über einen bisher unbekannten Pfad zu führen scheint (Zeng et al., 2012). Als Typ I-Weg gilt im Rahmen der Apoptose der extrinsische Weg, der über die genannten membranständigen Rezeptoren, respektive deren Todesdomänen, ausgelöst wird. Liganden, die zur Aktivierung führen, sind beispielsweise Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und weitere Vertreter der Zytokine. Die aktivierten Rezeptoren rekrutieren dabei intrazellulär die Adapterproteine TRADD (*TNF-receptor associated death domain protein*) und FADD (*Fas-associated death domain*), was zur Aktivierung der Kaspase 8 führt. Diese wiederum aktiviert bei genügend hoher Konzentration direkt die Effektorkaspasen 3, 6 und 7 und der Vorgang der Apoptose beginnt. Der Typ-II Weg oder intrazelluläre Weg beginnt aufgrund verschiedener Vorgänge im Inneren der Zelle. Dabei spielen zytotoxische Substanzen, virale Infektionen, DNA-Schäden oder der Entzug von Wachstumsfaktoren eine wichtige Rolle. Die Apoptose wird hier durch den Ausstrom von Cytochrom-c aus den Mitochondrien ausgelöst. Dieser Ausstrom wird unter anderem durch Proteine der Bcl-2 (*b-cell lymphoma 2*) Familie, vor allem Bax, ermöglicht. Andere Vertreter dieser Familie, wie Bcl-2, wirken dagegen auch antiapoptisch. Durch den Konzentrationsanstieg von Cytochrom-c im Zytoplasma entsteht das Apoptosoms. Dieses Proteinkonstrukt enthält auch die aktivierte Form der Kaspase 9. Diese ist nun analog zur Kaspase 8 in der Lage die Effektorkaspasen zu aktivieren und die eigentliche Apoptose einzuleiten (Youle et al., 2008). Ist im Falle des Typ-I Wegs die Konzentration der Kaspase 8 sehr gering, so können die Effektorkaspasen nicht suffizient

aktiviert werden. In diesem Fall wird durch die Kaspase 8 das Protein Bid (*BH3 interacting domain death agonist*) aktiviert. Bid gehört als *BH3-domain-only protein* zur Bcl-2 Familie und kann nun ebenfalls einen Cytochrom-c Ausstrom aus den Mitochondrien induzieren (Zeng et al., 2012). TNFRSF21, als Rezeptor der TNF-Rezeptor Familie, ist ebenfalls in der Lage Apoptose zu induzieren. Die intrazellulären Vorgänge sind jedoch vollkommen unabhängig von der Aktivität oder Anwesenheit von Kaspase 8. Untersuchungen zeigten, dass ein genereller Inhibitor aller Kaspasen (*benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethylketone*, Z-VAD-fmk) die TNFRSF21-induzierte Apoptose verhindert. Spezifische Inhibitoren gegen Kaspase 8 jedoch konnten den Prozess nicht beeinflussen. Auch bei si-RNA-induziertem *knockout* der Kaspase 8 kam es zu diesem Ergebnis (Zeng et al., 2012). Dazu passt die Beobachtung, dass durch Kaspaseinhibitoren auch die Aktivierung von Bid verhindert werden konnte. Bei der TNFRSF21-induzierten Apoptose kommt es jedoch trotzdem, wie beim intrinsischen Weg, zu einem Cytochrom-c Ausstrom unter der Einwirkung von Bax. Dieser Vorgang konnte auch durch Z-VAD-fmk oder *knockout* von Bid nicht blockiert werden und scheint damit unabhängig von Bid zu sein (Zeng et al., 2012). Bax dagegen ist ein essenzieller Faktor für die durch TNFRSF21 ausgelöste Apoptose. Die Vermutung liegt daher nahe, dass TNFRSF21 auf direktem Weg mit Bax interagiert und so den Cytochrom-c Ausstrom triggert. Immunpräzipitationsuntersuchungen scheinen dies zu bestätigen (Zeng et al., 2012). Auch steht die Expression von TNFRSF21 in enger Wechselwirkung mit dem Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B (Klíma et al., 2011).

#### 4.2.2 TNFRSF21 in der Tumor- und Melanomentstehung

Die Daten, die durch das NCBI zur Verfügung gestellt werden, zeigen, dass TNFRSF21 im Laufe der malignen Progression signifikant stärker exprimiert wird (siehe GDS1375/GDS1965/GDS1989 in Fig. 9). Dies stimmt im Wesentlichen auch mit den experimentellen Analysen überein (Fig. 14, Fig. 15). Diese zeigen, dass TNFRSF21 in den verschiedenen untersuchten Melanomzelllinien signifikant stärker exprimiert wird als in den benignen Melanozytenpopulationen (NHEM, *normal human epidermal melanocytes*). Bei der genaueren Betrachtung der Melanomzelllinien zeigt sich, dass die Expression in den metastasierten Vertretern (Mel Im, Mel Ju, Sk mel 3, Sk mel 28, HTZ19d, MV3, HMB2 und 501 Mel) im Vergleich mit den Zellen aus Primärtumoren (Mel Ei, Mel Wei, Mel Ho

und Mel Juso) noch einmal signifikant ansteigt. Die Ergebnisse, die im Vorfeld der experimentellen Arbeiten aus den vorhandenen Datenbanken gewonnen wurden, sind im Falle von TNFRSF21 also als deckungsgleich mit den eigens ermittelten Ergebnissen anzusehen. Jedoch ist TNFRSF21 ein Protein mit der Aufgabe die Apoptose auszulösen und wirkt mit seiner Funktion daher dem Tumorwachstum entgegen. Die Frage stellt sich daher, ob die verstärkte Produktion des Todesrezeptors (z. B. durch eine Mutation im Promotor o. Ä.) eine Fehlregulierung darstellt, die sich auf das Tumorwachstum positiv oder negativ auswirkt. Es ergeben sich zwei mögliche Überlegungen:

- Eine stärkere Expressierung des Gens und eine konsekutive Erhöhung der Dichte des völlig intakten und unveränderten Rezeptors kann dem Tumor per se keinen weiteren Überlebensvorteil bringen. Ist dies der Fall, könnte diese Erkenntnis vielmehr eine Art Schutzmechanismus der Zelle darstellen. Ausgelöst durch andere Mutationen, die die Entwicklung zum Melanom bedingen (*driver* Mutationen), könnten die intrazellulären Tumorsuppressoren, wie beispielsweise p53, aktiviert werden. Dies könnte in einem Versuch resultieren, die entartete Zelle zu vernichten bzw. vernichten zu lassen, um so weiteren Schaden vom Gesamtorganismus abzuwenden. Eine Möglichkeit hierfür wäre die vermehrte Produktion von TNFRSF21. Dazu passt, dass erhöhte Konzentrationen von TNFRSF21 und der dazugehörigen mRNA schon länger auch in anderen Tumorentitäten nachgewiesen werden, z. B. in Prostata Tumoren (Kasof et al., 2001). Dass diese Überexpression im vorliegenden Fall nicht effektiv zur Vernichtung der entarteten Zellen führt, ist offensichtlich. Andernfalls wäre eine negative Entwicklung im Tumorwachstum zu erwarten. Die Effektorfunktion von TNFRSF21 müsste also, in diesem Fall, im Verlauf der intrazellulären Kaskaden gestört sein. Die Störung müsste außerdem derart effektiv sein, dass die Tumorzellen gewissermaßen refraktär gegenüber dem Einfluss von TNFRSF21 werden. Proteine, die hierfür verantwortlich sein könnten, stammen beispielsweise erneut aus der Bcl-2 Familie (z. B. Bcl-x<sub>L</sub>) (Kasof et al., 2001). Andere antiapoptisch wirksame Proteine mit ähnlichem Einfluss sind *serine 32 phosphorylated I $\kappa$ B- $\alpha$*  (Kasof et al., 2001) oder Livin (Nachmias et al., 2007).

- Die andere Überlegung ist, dass die Überexprimierung von TNFRSF21 dem Tumor einen direkten Überlebensvorteil bringt. Einige Vertreter der Todesrezeptoren (z. B. TNFR1) zeigen bekanntermaßen das Phänomen des *shedding* (Chanthaphavong et al., 2012). Dieser Begriff bezeichnet einen Vorgang, bei dem mithilfe proteolytischer Enzyme (Metalloproteasen wie die ADAM-Moleküle etc.) die extrazelluläre Domäne des Rezeptors oder Teile von ihr abgespalten wird. Die extrazelluläre Domäne trägt bei dieser Art von Rezeptor auch das ligandenbindende Zentrum des Proteins. Die abgespaltenen Rezeptoranteile schweben in diesem Fall wie eine Art Wolke in der direkten Nachbarschaft der Zelle. Der Überlebensvorteil des Tumors, der durch dieses Manöver entsteht, ist folgender: Die aktivierenden Liganden, wie TNF- $\alpha$ , sind nun nicht mehr in der Lage, ungehindert bis zur Zellmembran und den noch immer dort lokalisierten Rezeptoren vorzudringen. Sie werden schon vorher durch die umherschwimmenden ligandenbindenden Domänen der Rezeptoren gebunden und abgefangen. Außerdem verringert sich durch das *shedding* die Rezeptordichte auf der Zelloberfläche. Beide Folgen tragen dazu bei, dass insgesamt die Wahrscheinlichkeit einer extrinsisch ausgelösten Apoptose unwahrscheinlicher wird. Für den speziellen Fall von TNFRSF21 konnte ebenfalls der Nachweis erbracht werden, dass solche *shedding*-Vorgänge vorkommen. Die vorliegenden Daten zeigen, dass der extrazelluläre Teil von TNFRSF21 durch Matrix-Metalloproteasen vom Typ MT1-MMP katalysiert wird (Tam et al., 2004).

#### 4.2.3 Klinische Bedeutungen der Veränderungen von TNFRSF21

Die Entdeckungen über die Fehlregulierung von TNFRSF21 eröffnen weiterhin auch diagnostische und prognostische Möglichkeiten. Untersucht wurde dies von Yang et al. für die Tumorentitäten Ovarialkarzinom, Sarkom, Karzinosarkom des Uterus, Blasen-, Leber und Pankreaskarzinom. Dabei wurde vorwiegend für das Ovarialkarzinom und das adulte Sarkom eine signifikante Steigerung der Serumkonzentration von TNFRSF21 im Gegensatz zur Kontrollgruppe gefunden. Die Frage, ob sich TNFRSF21 als serologischer Marker in der Onkologie eignet, kann damit noch nicht beantwortet werden. Wie oben erwähnt, stützten diese klinisch erhobenen Daten jedoch erneut die These, dass auch es auch bei TNFRSF21 zu *shedding* kommt.

Eine andere klinische Anwendbarkeit der Vorgänge, in die TNFRSF21 involviert ist, wurde von Lazar et al. untersucht. Dabei geht es um das antiapoptotisch wirksame Protein Livin (siehe oben). Auch die TNFRSF21-induzierte Apoptose kann durch Livin blockiert werden. Dieses Protein wurde auch speziell in Melanomen untersucht. Die Höhe der Expression von Livin korreliert dabei mit der Resistenz der Zellen für die verschiedenen apoptoseauslösenden Stimuli (Nachmias et al., 2007). Bei der Untersuchung von Melanompatienten zeigte sich, dass eine hohe Konzentration von Livin eng mit einer schlechten Prognose und einer niedrigen medianen Überlebenswahrscheinlichkeit assoziiert ist (Lazar et al., 2012). Damit stellt Livin einen wichtigen Faktor im Melanom dar, der die Zellen in die Lage versetzt, dem durch TNFRSF21 ausgelösten Zelltod zu entgehen.

### **4.3 HEY1 - hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1**

#### **4.3.1 HEY1, Effektorprotein des *Notch-pathway***

Das Gen HEY1 kodiert für ein Protein des menschlichen Organismus, das als Transkriptionsrepressor klassifiziert wird (Leal et al., 2012). Es ist daher in gesunden Zellen vorwiegend im Zellkern lokalisiert. Die Produktion von HEY1 (auch als CHF2, OAF1, HERP2, HESR1, HRT-1 oder BHLHb31 bekannt) wird dabei vorwiegend über den *Notch-pathway* reguliert. Dieser Signalweg gehört zu den wichtigsten Abläufen im menschlichen Organismus. Er reguliert im menschlichen Körper Prozesse wie Differenzierung, Proliferation und Apoptose. Der Aktivierung des Pfades entscheidet hierbei vor allem über das weitere Schicksal der Zelle, bzw. in welche Richtung die Entwicklung der Zelle geht. Daher ist dieser Signalweg von zentraler Bedeutung im Rahmen der embryonalen Entwicklung und Organogenese. Abgesehen davon finden auch in adulten Geweben weiterhin verschiedenste Prozesse statt, die mit der Neu- und Umbildung von Zellen und Zellverbänden einhergehen. Auch hier spielt der *Notch-pathway* eine entscheidende Rolle. Namensgebend sind die *Notch*-Rezeptoren (1-4), transmembrane Proteine, deren intrazelluläre Komponente abgespalten werden kann. Diese Abspaltung ist ein enzymatisch vermittelter Vorgang, der bei Kontakt mit den geeigneten Liganden stattfindet. Für die Aktivierung des Signalweges ist außer des geeigneten Liganden auch



eine mechanisch ausgelöste Konformationsänderung notwendig. Das zeigt sich in der Tatsache, dass auch die bindenden Liganden in einem Großteil der Fälle selbst fest an einer Zelloberfläche (benachbarte Zellen) gebunden sind. Über die *Notch*-Rezeptoren und -Liganden kommt es dadurch also in den meisten Fällen zu einem direkten Zell-Zell-Kontakt. Im seltenen Fall des Kontakts mit einer gelösten Form der Liganden findet daher zuerst ein Kontakt der Liganden mit anderen Strukturen der Ziel-Zellmembran statt. Dadurch werden die Liganden auf der Membran der Zielzelle fixiert, bevor ein Kontakt mit den *Notch*-Rezeptoren stattfindet (Fortini, 2009). Die aktivierte intrazelluläre Domäne (*Notch*-ICD, *Notch-intracellular domain*) transloziert daraufhin in den Zellkern und geht eine Bindung mit einem weiteren Transkriptionsrepressor (CSL/CBF1, *suppressor of hairless*, Lag-1) ein. Dieser wird dadurch aktiviert und der Komplex fungiert daraufhin als Transkriptionsfaktor für die Ziel-Gene von *Notch*-CSL. Diese Gene kodieren damit für die zum *Notch-pathway* gehörenden nachgeschalteten Effektorproteine. Die bestcharakterisierten Gruppen dieser Proteine sind die HES (*hairy enhancer of split*)- und die HEY (*hairy/enhancer of split-related with YRPW motif*)-Familie. Diese Proteine sind sogenannte *basic helix-loop-helix*-Proteine (bHLH) und fungieren durch ihre Struktur als Inhibitoren der Transkription (Niessen et al., 2008). Dabei spielt einerseits die Fusion der Proteine zu Homodimeren eine wichtige Rolle. Darüber hinaus wird jedoch auch die Bildung von HES-HEY-Heterodimeren beobachtet (Iso et al., 2003). Gene, deren Expression durch HEY1 und vergleichbare Faktoren gehemmt wird, sind beispielsweise AS-C (*achaete-scute complex*)-Gene (Campos-Ortega, 1993). Auch wird durch HEY1 die Genexpression dadurch gehemmt, dass es eine Bindung mit transkriptionsfördernden Proteinen eingeht und deren Einfluss hemmt. Dieser Mechanismus zeigt sich bei der Interaktion von HEY1 mit dem Androgenrezeptor (Belandia et al., 2005).

#### 4.3.2 HEY1 in der Tumor- und Melanomentstehung

Die aus den Datenbanken des NCBI entnommen Graphen zeigen deutlich eine signifikante Steigerung der Expression von HEY1 in Melanomzellen im Vergleich zu benignen Pigmentzellen (siehe GDS1375 in Fig. 10). Die Daten zeigen ebenfalls, dass die Expression von HEY1 mit zunehmender Malignität der Zellen noch weiter ansteigt (siehe GDS1965/GDS1989 in Fig. 10). Hinzu kommt bei HEY1 der *affymetrix array* GDS1761 (siehe Fig. 10), der eine signifikant stärkere Expression des Gens im malignen Melanom im

Vergleich mit anderen untersuchten Tumorsorten zeigt. Dies ist insofern sehr interessant, als dass dieses Resultat eine spezifische Fehlregulierung im Rahmen der Entstehung und/oder Progression des malignen Melanoms suggeriert. Die experimentellen Untersuchungen zeigten ein nicht ganz einheitliches Bild (Fig. 16, Fig. 17, Fig. 18). Es konnte eine signifikant erhöhte Expression in den primären Melanomzelllinien (Mel Ei, Mel Wei, Mel Ho und Mel Juso) im Vergleich zu den normalen Melanozyten (NHEM, *normal human epidermal melanocytes*) nachgewiesen werden (Fig. 16, Fig. 17, Fig. 18). Im weiteren Verlauf der malignen Progression hin zu den metastasierten Melanomzelllinien (Mel Im, Mel Ju, Sk mel 3, Sk mel 28, HTZ19d, MV3, HMB2 und 501 Mel) zeigen sich innerhalb dieser Gruppe signifikante Unterschiede. Über alle metastasierten Vertreter gemittelt, zeigt sich daher keine signifikante Steigerung der Expression im Vergleich zu den benignen Melanozyten oder den primären Tumorzellen (Fig. 16, Fig. 17). Die graphische Darstellung der Expression in den verschiedenen Zelllinien (Fig. 16) suggeriert jedoch das Vorhandensein von Subpopulationen innerhalb der metastasierten Melanomzelllinien hinsichtlich ihrer Expression von HEY1. Die Zelllinien Sk mel 3, Sk mel 28 und MV3 zeigen augenscheinlich keine erhöhte Expression von HEY1 im Vergleich zu NHEM oder Primärtumorzellen. Im Gegenteil nimmt die Expression hier im Vergleich zu den primären Zelllinien sogar signifikant ab. Werden diese drei Zelllinien jedoch aus der Gruppe der metastasierten Melanomzelllinien ausgeschlossen (Fig. 18), so ergibt sich für HEY1 auch hier eine signifikante Steigerung der Expression im Vergleich zu den Melanozyten sowie den primären Melanomzelllinien. Die Ursache der unterschiedlichen Expression in den metastasierten Melanomzelllinien ist damit nicht direkt ersichtlich. Eine naheliegende Erklärung ist, dass der vereinheitlichende Begriff des malignen Melanoms – oder hier speziell des metastasierten malignen Melanoms – auf genetischer Ebene nicht einheitlich ist. Es gibt offensichtlich auch innerhalb dieser Tumorspezies genetische Unterschiede, die entweder phänotypisch in einer höheren Überlebenswahrscheinlichkeit für den Tumor resultieren oder auch nicht. Eine weitere Illustration dieser Unterschiede zeigt der *affymetrix array* GDS1314 (Fig. 5). Auch dort wurden verschiedene Melanomzelllinien hinsichtlich ihrer Expressionsstärke untersucht und auch dort zeigen die verschiedenen Zelllinien mitunter signifikante Unterschiede hinsichtlich der Expression desselben Gens.

Mit der Information, dass es sich bei HEY1 um einen Transkriptionsrepressor handelt, stellt sich die Frage inwieweit die verstärkte Expression von HEY1 dem Tumor von Nutzen sein kann, oder ob sie es überhaupt ist. Daraus ergeben sich auch hier zwei grundsätzliche Überlegungen:

- Interessante Daten zur Rolle von HEY1 im Rahmen dieser Frage finden sich beim Prostatakarzinom. Hier wurde auch die schon erwähnte Bindung von HEY1 an den Androgenrezeptor gefunden (Belandia et al., 2005). Zuerst ist bemerkenswert, dass auch in den fortgeschrittenen Stadien des Prostatakarzinoms eine deutliche Steigerung der Expression von HEY1 zu beobachten ist. Genauer gesagt, findet sich eine starke Vermehrung eines Teils des Chromosoms 8q. Dieser Teil beherbergt auch den Gen-Lokus für HEY1. Auch hier wurde die verstärkte Expression des Transkriptionsrepressor als eher paradox gesehen. Die interessante Beobachtung war nun, dass sich nicht nur die Menge an HEY1 in den Zellen des Karzinoms, verglichen mit Zellen einer benignen Prostatahyperplasie (BPH), ändert. Es ändert sich auch in ganz entscheidendem Maße die intrazelluläre Verteilung von HEY1. HEY1 ist bei nahezu allen untersuchten Proben von Prostatakarzinomzellen nur im Zytoplasma, nicht jedoch im Nukleus, zu finden (Belandia et al., 2006). Das bedeutet, dass HEY1 entweder aktiv aus dem Kern ausgeschleust wird, oder nach der Synthese im Zytoplasma nicht in den Kern eingeschleust wird. Dies ist ein starker Hinweis darauf, dass HEY1 hier dem Tumorwachstum und der malignen Progression keineswegs dient. Es scheint vielmehr ein Hemmstoff dieses Prozesses zu sein, weshalb es von seinem angestammten Platz im Zellkern entfernt wird. Im Zytoplasma kann es seiner Aufgabe nicht nachkommen und hat damit seine für den Tumor schädliche Wirkung verloren. Damit ist jedoch nicht erklärt, weshalb es dann überhaupt in größeren Mengen produziert wird. Ein möglicher Ansatz ist hier, dass der Nutzen sich über andere Gene entfaltet, die ebenfalls auf Chromosom 8q lokalisiert sind und dass dieser Nutzen die negativen Auswirkungen von HEY1 übersteigt, bzw. dass diese negativen Auswirkungen durch die Ausschleusung aus dem Kern einfach umgangen werden können (Belandia et al., 2005 und Belandia et al., 2006). Allgemein deuten diese

Beobachtungen darauf hin, dass HEY1 ein dem Tumorprogress eher hinderlicher Faktor ist, dessen Einfluss auf die ein oder andere Art umgangen werden muss.

- Die entgegengesetzte Argumentation wäre auch hier, dass eine Überexpression von HEY1 dem Tumor einen direkten Vorteil verschafft. Grundlage für diese Überlegungen sind Beobachtungen bei dem mit HEY1 nahe verwandten HES1-Gen und dessen Signalweg. Für HES1 wurde wiederholt nachgewiesen (Sang et al., 2008 und Sang et al., 2009), dass es einen wichtigen Faktor darstellt, der Zellen in einem nicht ausdifferenzierten Stadium fixieren kann. Damit stellt es gewissermaßen eine Barriere im Zellzyklus dar, wodurch die Zellen dem natürliche Entwicklungs- und Alterungsprozess entgehen können. Dies ist im menschlichen Körper physiologischerweise an vielen Stellen ein notwendiger Vorgang und geht vor allem mit der Umorganisation von DNA einher. Dabei ist die jeweilige Struktur des Chromatins mit ausschlaggebend für die Transkription verschiedener Gene und HES1 ein Faktor, der darauf Einfluss zu nehmen vermag (Sang et al., 2009). Problematisch jedoch ist, dass das Entgehen einer endgültigen Zelldifferenzierung und damit der Seneszenz auch einen essenziellen Vorgang für Tumorzellen darstellt. Die Inaktivierung von HES1 führte in den Untersuchungen dabei auch in Tumorzellen zu einer spontanen Zelldifferenzierung (Sang et al., 2009).

Außerdem gibt es eine weitere Möglichkeit, wie die Überexpression von HEY1 dem Tumorgeschehen von Nutzen sein könnte. Als Transkriptionsrepressor könnte HEY1 theoretisch auch in der Lage dazu sein, die Expression von Genen zu blockieren, die dem Tumorwachstum im Wege stehen (Gene, die erwiesenermaßen durch HEY1 blockiert werden, siehe oben). Hier kommen nun eine ganze Reihe sogenannter Tumorsuppressorgene in Frage. Die bekanntesten Vertreter dieser Gruppe sind die Retinoblastomprotein und das p53-Protein. Daten über eine solche Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen durch HEY1 gibt es jedoch noch nicht.

#### **4.4 Die *affymetrix arrays* als Ausgangspunkt experimenteller Grundlagenforschung?**

Die Herangehensweise der vorliegenden Arbeit ist folgende: Als Ausgangspunkt für spätere experimentelle Untersuchungen dient eine Online-Datenbank. In diesem Fall wurden die Daten der *GEO Profiles* verwendet, die sich auf der Internetseite des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) befinden. Dort sind diese Daten frei zugänglich. Es handelt sich um Genexpressionsanalysen die mit Hilfe von *affymetrix arrays* angefertigt wurden. Nach verschiedenen, schon ausführlich ausgeführten Kriterien konnten hier Gene ausgesucht werden, die laut den vorhandenen Ergebnissen als interessant zu bewerten waren. Durch die späteren experimentellen Untersuchungen werden nun einerseits neue Daten und Erkenntnisse gewonnen, andererseits stellt die aktuelle Arbeit aber auch eine Überprüfung der vorhandenen Ergebnisse dar. Dies gilt insbesondere, da beide Technologien die Genexpression auf der Ebene der mRNA untersuchen. Bei beiden Technologien (*affymetrix arrays* und quantitative *real time* PCR) ist das eigentliche Reagenz zwar DNA, jedoch handelt es sich dabei um cDNA (*copy*-DNA), die durch reverse Transkription der RNA gewonnen wurde.

##### **4.4.1 Gemeinsamkeiten und Unterschiede in den Ergebnissen**

Interessant ist nun nicht nur, wie die ermittelten Daten hinsichtlich Steigerung oder Absinken der Expressionsstärke zu interpretieren sind (siehe oben). Es ist auch wichtig zu betrachten, inwieweit die neuen Ergebnisse konkordant mit denen der Online-Datenbank ist. Außerdem ist interessant, wie die Ergebnisse der *affymetrix arrays* im Vergleich zu anderen wissenschaftlichen Ergebnissen stehen. Das Ergebnis kann im vorliegenden Fall selbstverständlich nicht gänzlich für eine Bewertung der Datenbank dienen.

Im folgenden werden daher zunächst exemplarisch einige Gene näher betrachtet, die durch die Analyse von GDS1375 in die Kategorien „überexprimiert“ bzw. „unterexprimiert“ (siehe Tab. 3 und 4) eingeteilt wurden. Als nächstes werden die Kandidaten der Endauswahl noch einmal in den wissenschaftlichen Kontext gesetzt (siehe die Liste der überdurchschnittlich interessanten Gene im Abschnitt 3.1). Zuletzt werden noch einmal zusammenfassend die Ergebnisse der experimentell untersuchten Gene FHOD3, TNFRSF21 und HEY1 verglichen.

Primär wurde durch den manuellen Filterungsprozess des *affymetrix* arrays GDS1375 eine große Anzahl an Genen für die weitere Auswahl gewonnen (siehe Tab. 3 und 4). Als überexprimiert im malignen Melanom wurde im vorliegenden Fall beispielsweise BAX ermittelt (*bcl-2-associated X protein*). Dies deckt sich mit den Ergebnissen anderer Forschungsgruppen (Leiter et al., 2000, Tang et al., 1998). Gleichmaßen spiegeln auch die als überexprimiert gefundenen Werte von JUND (Yang et al., 2005), SILV (Rothberg et al., 2008), SOX10 (Shakhova et al., 2012), TBX2 (Lu et al., 2010) und TYR (Chodurek et al., 2012) die aktuelle Forschungslage wieder. Dies sind Beispiele für Gene, die mittlerweile weltweit anerkannt eine Rolle in der Genetik von malignen Tumoren im Allgemeinen und des malignen Melanoms im Speziellen spielen. Ein Gegenbeispiel in der Gruppe der überexprimierten Gene aus Tabelle 3 ist CDH3 (*cadherin 3, type 1*). Laut GDS1375 zeigt es die Kriterien eines überexprimierten Gens, doch schon in der weiteren Analyse durch die folgenden *arrays* (siehe Tab. 5) zeigt CDH3 ausschließlich Merkmale eines unterexprimierten Gens. Dies wird auch durch andere Forschungsergebnisse gestützt (Ryu et al., 2007). Ein weiteres Beispiel für widersprüchliche Resultate ist CITED1 (*Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain*). In der Literatur lassen sich einerseits Daten finden, die für eine positiv mit der Progression von Karzinomen der Schilddrüse (Prasad et al., 2005) assoziierte Rolle sprechen. Andererseits weisen andere Ergebnisse auf ein gegensätzliches Verhalten beim malignen Melanom hin (Ryu et al., 2007). Im Verlauf des Filterungsprozesses (siehe Tab. 5) zeigt sich für CITED1 ebenfalls ein widersprüchliches Ergebnis, mit Charakteristika sowohl eines über-, wie eines unterexprimierten Gens.

Bei den laut GDS1375 unterexprimierten Vertretern (siehe Tab. 4) sind die Gene der Keratine Beispiele dafür, dass die Auswahl hier Gene liefert, die erwiesenermaßen im Melanom eine untergeordnete Rolle spielen. Dies zeigt sich durch zwei Eigenschaften. Erstens fallen die Vertreter KRT (*keratin*) 1, 5, 10, 14, 15 und 23 durch die Analyse von GDS1375 alle in die Gruppe der unterexprimierten Gene. Außerdem wird zweitens im weiteren Verlauf des Prozesses (siehe Tab. 6) klar, dass der Großteil der Keratingene komplett aus der Liste der interessanten Gene herausfällt. Dies stimmt mit der Annahme überein, dass die Expression der Keratingene in den Hautproben von GDS1375 vorwiegend durch die Keratinozyten geleistet wird. Das trifft beispielsweise auch für

keratinassoziierte Gene wie LOR (*loricrin*) zu (Riker et al., 2008). Die Daten von Riker et al. legen jedoch für das Gen GJA1 (*gap junction protein alpha 1*) nahe, dass seine Expression im Melanom höher ist als in den untersuchten NHEMs. Ähnliches wurde auch von Villares et al. 2009 nachgewiesen. Das widerspricht jedoch den Ergebnissen von GDS1375, wodurch GJA1 in die unterexprimierten Gene aufgenommen wurde. Ein anderes *gap junction* Gen (GJB3) scheint jedoch, wie auch in unseren Ergebnissen, in malignen Tumoren unterexprimiert zu sein (Zhang et al., 2012).

Nach der Betrachtung aller *affymetrix arrays* konnte eine Liste von Genen erstellt werden, die anhand der festgelegten Kriterien als überdurchschnittlich interessant zu bewerten waren (siehe Endauswahl im Abschnitt 3.1). Auch hierbei erfolgte die Einteilung in über- und unterexprimierte Vertreter. Es folgt zuerst eine Auflistung der überexprimierten Kandidaten dieser Liste, für die eine Assoziation mit der Entwicklung maligner Tumore in der aktuellen wissenschaftlichen Literatur ermittelt werden konnte:

- ARNT2 (*aryl-hydrocarbon receptor nuclear translocator 2*), Mammakarzinom (Qin et al., 2011)
- BCL2A1 (*BCL2-related protein A1*), malignes Melanom (Senft et al., 2012)
- FGF1 (*fibroblast growth factor 1*), malignes Melanom u. A. (Di Serio et al., 2008)
- HSPH1 (*heat shock 105kDa/110kDa protein 1*), malignes Melanom (Park et al., 2009)
- NCAPG (*non-SMC condensin I complex*), malignes Melanom (Ryu et al., 2007)
- PEX6 (*peroxisomal biogenesis factor*), Ovarialkarzinom (Sun et al., 2009)
- SPP1 (*secreted phosphoprotein 1*), malignes Melanom u. A. (Maier et al., 2012)
- TRIB2 (*tribbles homolog 2 - Drosophila*), malignes Melanom u. A. (Zanella et al., 2010)

Im Gegensatz dazu wurde CRIP2 (*cysteine-rich protein 2*) aus der Gruppe der überexprimierten Gene von Lo et al. negativ mit der Entwicklung von Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus assoziiert (Lo et al., 2012). Auch von CRYAB (*crystallin, alpha B*) ist eine als Tumorsuppressor bekannte Funktion bekannt (Qiao et al., 2012). DNAJB6 (*Dnaj (Hsp40) homolog, subfamily B, member 6*) ist in Mammakarzinomzellen als unterexprimiert charakterisiert worden (Mitra et al., 2012).

FKBP10 (*FK506 binding protein 10*) ist im Ovarialkarzinom ebenfalls als herunterreguliert beschrieben (Henriksen et al., 2011). LZTS1 (*leucine zipper, putative tumor suppressor 1*) wurde in Mammakarzinomzellen als unterexprimiert gefunden (Wang et al., 2011). PLOD1 (*procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1*) wurde als unterexprimiert in rhabdoiden Tumoren charakterisiert (Gadd et al., 2010). SEMA3B (*semaphorin 3B*) wird allgemein, und auch im malignen Melanom, ebenfalls als Inhibitor von Tumorwachstum angesehen (Bielenberg et al., 2007 und Klagsbrun et al., 2010). Zu den nicht aufgeführten Vertretern der Liste konnte keine bisher bekannte Assoziation mit einem malignen Geschehen gefunden werden.

Bei den Vertretern der unterexprimierten Gene aus oben genannter Liste sind folgende Vertreter nachweislich in Tumorprozesse involviert und zeigen dabei eine geringer Expression als in benignen Geweben:

- ABHD9 (*abhydrolase domain containing 9*), kolorektales Karzinom (Oster et al., 2011)
- CSTA (*cystatin A*), Mammakarzinom (Lee et al., 2012)
- DSG1 (*desmoglein 1*), malignes Melanom (Li et al., 2001)
- EVPL (*envoplakin*), malignes Melanom (Martins et al., 2011)
- HIP1R (*huntingtin interactin protein 1 related*), gastrale Zellmethaplasie (murin) (Liu Z. et al., 2012)
- KLK11 (*kallikrein-related peptidase 11*), Larynxkarzinom u. A. (Patsis et al., 2012)
- PHYHIP (*phytanoyl-CoA 2-hydroxylase interacting protein 2*), Nebennierenrindentumore (Durand et al., 2011)
- PKP1 (*plakophilin 1*), Ösophaguskarzinom u. A. (Kaz et al., 2012)
- PPL (*periplakin*), Ösophaguskarzinom (Nishimori et al., 2006)
- RBM35B (*RNA binding motif protein 35B*), nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom (Gemmell et al., 2011)
- SCN1A (*sodium channel, nonvoltage-gated 1 alpha*), Neuroblastom u. A. (Carén et al., 2011)

Im Gegensatz hierzu wurde LYPD3 (*LY6/Plaur domain containing 3*) in beispielsweise kolorektalen Tumoren als überexprimiert charakterisiert (Oshiro et al., 2012). Für P2RY14



(*purinergic receptor P2Y, G-protein coupled 14*) konnte eine positive Assoziation mit Gliomen nachgewiesen werden (Krzemiński et al., 2008). Analysen von SCEL (*sciellin*) lieferten Hinweise für eine Überexpression des Gens in papillären Schilddrüsenkarzinomen (Huang et al., 2001). Für RAB25 (*RAB25, member RAS oncogene family*) finden sich Hinweise in beide Richtungen der möglichen Assoziation mit tumorösen Geschehen. Bei Ösophaguskarzinomen vom Typ des Plattenepithelkarzinoms wurde RAB25 eine tumorsupprimierende Wirkung zugeschrieben und eine erniedrigte Expression im Tumor nachgewiesen (Tong et al., 2012). In Ovarialkarzinomzellen wurden Hinweise für eine tumorfördernde Aktivität nachgewiesen, die mit einer Überexpression im Tumor einhergingen (Liu Y. et al., 2012). Die nicht erwähnten Vertretern der Liste erbrachten bei der Suche in der aktuellen Literatur keine bisher bekannte Assoziation mit malignen Prozessen.

Im Rahmen des experimentellen Teils dieser Arbeit wurden schlussendlich drei Gene untersucht. Hier sind die aktuellen Ergebnisse nicht deckungsgleich mit denen der *arrays* der Online-Datenbank. Laut den Daten, die sich auf der Seite des NCBI finden, war bei allen drei Genen (FHOD3, TNFRSF21 und HEY1) eine signifikante Steigerung der Expression in den Tumorzellen im Vergleich mit den benignen Melanozyten zu erwarten. Diese signifikanten Steigerungen ließen sich jedoch nur bei TNFRSF21 und HEY1 verifizieren. Im Falle von FHOD3 konnten keine signifikanten Veränderungen ermittelt werden. Damit ergibt sich ein Schnitt von zwei aus drei. In unserem Fall stellt sich damit die Frage, inwieweit die *arrays* als Ausgangspunkt für experimentelle Analysen dienen können. In unserem Fall ist eine „Erfolgsquote“ von 66,67% durchaus als gut zu bewerten. Fraglich ist jedoch, wie sinnvoll diese Herangehensweise beispielsweise für weitaus größer angelegte Untersuchungen ist. Bei der Durchführung der quantitativen *real time* PCR in kleinem Rahmen, wie hier geschehen, entstehen keine allzu großen Kosten. Untersuchungen in größerem Stil oder auch Untersuchungen mit teureren Apparaturen könnten sich auch größeren Schwierigkeiten gegenüber sehen. Der ökonomische Aufwand und die verbundenen Risiken sind schließlich ungleich größer.

#### 4.4.2 Mögliche Ursachen der Unterschiede

Eine wichtige Frage ist selbstverständlich auch die nach der Ursache für die teilweise abweichenden Ergebnisse zwischen den Daten der Online-Datenbank und den neu ermittelten im Rahmen dieser Arbeit. Mögliche Erklärungen liefern folgende Überlegungen: Ein wichtiger Punkt sind die untersuchten Zellen, Melanozyten wie Tumorzellen. Wie schon öfter angemerkt, kann der Begriff der Melanomzelle nicht als einheitlicher Begriff verstanden werden. Allein in unseren Analysen zeigen sich im Bezug auf die Expression eines Gens enorme Unterschiede zwischen den verschiedenen Zelllinien (siehe Fig. 16). Es ist anzunehmen, dass auch im Vergleich mit anderen Tumor- oder Melanozytenzelllinien solche Unterschiede auftreten. Dazu ist nur bei einem Teil der *affymetrix arrays* ersichtlich, welche Zelllinien dort verwendet wurden. Als Beispiel kann hier GDS1314 dienen. Von den fünf dort untersuchten Melanomzelllinien, findet sich nur eine in unseren experimentellen Analysen wieder, Sk-mel 28. Die genetischen Unterschiede zwischen den verschiedenen Zelllinien sind also ein wichtiger Punkt.

Dazu kommt vor allem bei den Melanozyten (NHEMs) eine weitere Eigenheit dieser Zellen. Die NHEMs werden in den Kulturmedien stets vermehrt und am Leben gehalten, um Material für weitere Untersuchungen zu liefern. Bei diesem Prozess ist es unausweichlich, dass diese Zellen mit der Zeit auch teilweise Eigenschaften der malignen Pigmentzellen annehmen. Im Labor werden die Melanozyten stetig durch die Gabe von Wachstumsfaktoren zur Proliferation angeregt. Mit immer längerer Verweildauer verringert sich daher auch der Unterschied zu malignen Melanomzellen. Dies stellt ein weiteres Problem dar.

Ein letzter Punkt liegt in den unterschiedlichen Methoden, mit denen die Analysen durchgeführt wurden. Bei den *affymetrix arrays* wurden die Expressionsanalysen mithilfe von Gen-Chips durchgeführt. Hierbei werden mehrere hundert bis tausend Gene gleichzeitig in einem Arbeitsgang analysiert. Die Analyse beruht dabei ebenfalls auf einer Hybridisierung von cDNA (produziert aus mRNA der untersuchten Zellen) mit den DNA-Sonden des Gen-Chips. Dies ist ein Verfahren mit einer nicht zu vernachlässigenden Fehlerquote. Im Vergleich dazu liefert die quantitative *real time* PCR-Technologie

genauere Ergebnisse. Hier werden pro Gen zwei eigene Oligonukleotidprimer verwendet, die eigens etabliert werden, um ein möglichst valides Ergebnis zu liefern.

Angesichts vor allem des letzten Punktes sehen wir keinen Grund dazu, die von uns experimentell erhobenen Daten in Frage zu stellen. Die Frage, ob der Weg, der zur Auswahl der Gene geführt hat, valide und nachahmenswert ist, kann im Rahmen der vorliegenden Arbeit (mit den genannten Einschränkungen) positiv beantwortet werden.

## 5 Literaturverzeichnis

Bartkova J., Lukas J., Guldberg P., Alsner J., Kirkin A. F., Zeuthen J., Bartek J. (1996), "The p16-cyclin D/Cdk4-pRb pathway as a functional unit frequently altered in melanoma pathogenesis", *Cancer Res.* 56(23): 5475-83

Belandia B., Powell S. M., García-Pedrero J. M., Walker M. M., Bevan C. L., Parker M. G. (2005), "Hey1, a mediator of notch singaling, is an androgen receptor corepressor", *Mol Cell Biol* 25(4): 1425-36

Belandia B., Parker M. G. (2006), "Nuclear receptor regulation gears up another Notch", *Nucl Recept Signal*

Bielenberg D. R., Klagsbrun M. (2007), "Targeting endothelial and tumor cells with semaphorins", *Cancer Metastasis Rev.* 26(3-4): 421-31

Bikfalvi A., Klein S., Pintucci G., Rifkin D. B. (1997), "Biological roles of fibroblast growth factor-2", *Endocr Rev* 18(1): 26-45

Braun-Falco O., Plewig G., Wolff H. H., Burgdorf W. H. C., Landthaler M. et al. (2005, 5. Auflage), "Dermatologie und Venerologie"

Campos-Ortega J. A. (1993), "Mechanisms of early neurogenesis in *Drosophila melanogaster*", *J Neurobiol* 24(10): 1305-27

Carén H., Djos A., Nethander M., Sjöberg R. M., Kogner P., Enström C., Nilsson S., Martinsson T. (2011), "Identification of epigenetically regulated genes that predict patient outcome in neuroblastoma", *BMC Cancer.* 11:66

Chanthaphavong R. S., Loughran P. A., Lee T. Y., Scott M. J., Billiar T. R. (2012), "A role for cGMP in iNOS-induced TACE/ADAM17 activation, translocation, and TNFR1 shedding in hepatocytes", *J Biol Chem*

Chodurek E., Orchel A., Orchel J., Kurkiewicz S., Gawlik N., Dzierżewicz Z., Stępień K. (2012), "Evaluation of melanogenesis in A-375 melanoma cells treated with 5,7-dimethoxycoumarin and valproic acid", *Cell Mol Biol Lett* 17(4): 616-32

Clark W.H. Jr., Elder D. E., Guerry D. 4th, Epstein M. N., Greene M. H., Van Horn M. (1984), "A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma", *Hum Pathol* 15(12): 1147-65

Clark W.H. (1991), "Tumor progression and the nature of cancer", *Br J Cancer* 64(4): 631-44

- Di Serio C., Doria L., Pellerito S., Prudovsky I., Micucci I., Massi D., Landriscina M., Marchionni N., Masotti G., Tarantini F. (2008), "The release of fibroblast growth factor-1 from melanoma cells requires copper ions and is mediated by phosphatidylinositol 3-kinase/Akt intracellular signaling pathway", *Cancer Lett.* 267(1): 67-74
- Durand J., Lampron A., Mazzuco T. L., Chapman A., Bourdeau I. (2011), "Characterization of differential gene expression in adrenocortical tumors harboring beta-catenin (CTNNB1) mutations", *J Clin Endocrinol Metab.* 96(7): 1206-11
- Dutton-Regester K., Hayward N. K. (2012), "Reviewing the somatic genetics of melanoma: from current to future analytical approaches", *Pigment Cell Melanoma Res* 25(2): 144-154
- Fecher L. A., Cummings S. D., Keefe M. J., Alani R. M. (2007), "Toward a molecular classification of melanoma", *J Clin Oncol* 25(12): 1606-20
- Fisher G. J., Kang S., Varani J., Bata-Csorgo Z., Wan Y., Datta S., Voorhees J. J. (2002), "Mechanisms of photoaging and chronological skin aging", *Arch. Dermatol.* 138(11): 1462-70
- Fortini M. E. (2009), "Notch signaling: the core pathway and its posttranslational regulation", *Dev Cell* 16(5): 633-47
- Gadd S., Sredni S. T., Huang C. C., Perlman E. J. (2010), "Rhabdoid tumor: gene expression clues to pathogenesis and potential therapeutic targets", *Lab Invest.* (5): 724-38
- Gemmill R. M., Roche J., Potiron V. A., Nasarre P., Mitas M., Coldren C. D., Helfrich B. A., Garrett-Mayer E., Bunn P. A., Drabkin H. A. (2011), "ZEB1-responsive genes in non-small cell lung cancer", *Cancer Lett.* 300(1): 66-78
- Harris E. S., Gauvin T. J., Heimsath E. G., Higgs H. N. (2010), "Assembly of filopodia by the formin FRL2 (FMNL3) ", *Cytoskeleton (Hoboken)* 67(12): 755-72
- Henriksen R., Sørensen F. B., Ørntoft T. F., Birkenkamp-Demtroder K. (2011), " Expression of FK506 binding protein 65 (FKBP65) is decreased in epithelial ovarian cancer cells compared to benign tumor cells and to ovarian epithelium", *Tumour Biol.* 32(4): 671-6
- Huang Y., Prasad M., Lemon W. J., Hampel H., Wright F. A., Kornacker K., LiVolsi V., Frankel W., Kloos R. T., Eng C., Pellegata N. S., de la Chapelle A. (2001), "Gene expression in papillary thyroid carcinoma reveals highly consistent profiles", *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(26): 15044-9
- Iso T., Kedes L., Hamamori Y. (2003), "HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway", *J Cell Physiol* 194(3): 237-55
- Kanaya H., Takeya R., Takeuchi K., Watanabe N., Jing N., Sumimoto H. (2005), "Fhos2, a novel formin-related actin-organizing protein, probably associates with the nestin intermediate filament", *Genes Cells* 10(7): 665-78

- Kan-o M., Takeya R., Taniguchi K., Tanoue Y., Tominaga R., Sumimoto H. (2012), "Expression and subcellular localization of mammalian formin Fhod3 in the embryonic and adult heart", *PLoS One* 7(4)
- Kasof G. M., Lu J. J., Liu D., Speer B., Mongan K. N., Gomes B. C., Lorenzi M. V. (2001), "Tumor necrosis factor-alpha induces the expression of DR6, a member of the TNF receptor family, through activation of NF-kappaB", *Oncogene* 20(55): 7965-75
- Katoh M., Katoh M. (2004), "Identification and characterization of human FHOD3 gene in silico", *Int J Mol Med* 13(4): 615-20
- Kaz A. M., Luo Y., Dzieciatkowski S., Chak A., Willis J. E., Upton M. P., Leidner R. S., Grady W. M. (2012), "Aberrantly methylated PKP1 in the progression of Barrett's esophagus to esophageal adenocarcinoma", *Genes Chromosomes Cancer*. (4): 384-93
- Klagsbrun M., Shimizu A. (2010), "Semaphorin 3E, an exception to the rule", *J Clin Invest*. 120(8): 2658-60
- Klíma M., Broučková A., Koc M., Anděra L. (2011), "T-cell activation triggers death receptor-6 expression in a NF-κB and NF-AT dependent manner", *Mol Immunol*. 48(12-13): 1439-47
- Krzemiński P., Pomorski P., Barańska J. (2008), "The P2Y14 receptor activity in glioma C6 cells", *Eur J Pharmacol*. 594(1-3):49-54
- Lazar I., Perlman R., Lotem M., Peretz T., Ben-Yehuda D., Kadouri L. (2012), "The clinical effect of the inhibitor of apoptosis protein livin in melanoma", *Oncology* 82(4): 197-204
- Leal M. C., Surace E. I., Holgado M. P., Ferrari C. C., Tarelli R., Pitossi F., Wisniewski T., Castaño E. M., Morelli L. (2012), "Notch signaling proteins HES-1 and Hey-1 bind to insulin degrading enzyme (IDE) proximal promoter and repress its transcription and activity: implications for cellular Aβ metabolism", *Biochim Biophys Acta* 1823(2): 227-35
- Lee S., Stewart S., Nagtegaal I., Luo J., Wu Y., Colditz G., Medina D., Allred D. C. (2012), "Differentially expressed genes regulating the progression of ductal carcinoma in situ to invasive breast cancer", *Cancer Res*. 72(17): 4574-86
- Leiter U., Schmid R. M., Kaskel P., Peter R. U., Krähn G. (2000), "Antiapoptotic bcl-2 and bcl-xL in advanced malignant melanoma", *Arch Dermatol Res* 292(5): 225-32
- Li A., Mechesky L. M. (2012), "Melanoblasts on the move: Rac1 sets the pace", *Small GTPases* 3(2): 115-9
- Li G., Schaidt H., Satyamoorthy K., Hanakawa Y., Hashimoto K., Herlyn M. (2001), "Downregulation of E-cadherin and Desmoglein 1 by autocrine hepatocyte growth factor during melanoma development", *Oncogene*. 20(56): 8125-35

- Liu Y., Tao X., Jia L., Cheng K. W., Lu Y., Yu Y., Feng Y. (2012), "Knockdown of RAB25 promotes autophagy and inhibits cell growth in ovarian cancer cells", *Mol Med Report*. 6(5): 1006-12
- Liu Z., Demitrack E. S., Keeley T. M., Eaton K. A., El-Zaatari M., Merchant J. L., Samuelson L. C. (2012), "IFN $\gamma$  contributes to the development of gastric epithelial cell metaplasia in Huntingtin interacting protein 1 related (Hip1r)-deficient mice", *Lab Invest*. 92(7): 1045-57
- Lo P. H., Ko J. M., Yu Z. Y., Law S., Wang L. D., Li J. L., Srivastava G., Tsao S. W., Stanbridge E. J., Lung M. L. (2012), "The LIM domain protein, CRIP2, promotes apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma", *Cancer Lett*. 316(1): 39-45
- Lu J., Li X. P., Dong Q., Kung H. F., He M.L. (2010), "TBX2 and TBX3: the special value for anticancer drug targets", *Biochim Biophys Acta*. 1806(2):268-74
- Maier T., Laubender R. P., Sturm R. A., Klingenstein A., Korting H. C., Ruzicka T., Berking C. (2012), "Osteopontin expression in plasma of melanoma patients and in melanocytic tumours", *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 26(9): 1084-91
- Martins W. K., Esteves G. H., Almeida O. M., Rezze G. G., Landman G., Marques S. M., Carvalho A. F., L Reis L. F., Duprat J. P., Stolf B. S. (2011), "Gene network analyses point to the importance of human tissue kallikreins in melanoma progression", *BMC Med Genomics*. 4:76
- Miller A. J., Mihm M. C. Jr. (2006), "Melanoma", *N Engl J Med* 355(1): 51-65
- Mitra A., Rostas J. W., Dyess D. L., Shevde L. A., Samant R. S. (2012), "Micro-RNA-632 downregulates DNAJB6 in breast cancer", *Lab Invest*. 92(9): 1310-7
- Nachmias B., Lazar I., Elmalech M., Abed-El-Rahaman I., Asshab Y., Mandelboim O., Perlman R., Ben-Yehuda D. (2007), "Subcellular localization determines the delicate balance between the anti- and pro-apoptotic activity of livin", *Apoptosis* 12(7): 1129–1142
- Niessen K., Karsan A. (2008), "Notch signaling in cardiac development", *Circ Res* 102(10): 1169-81
- Nishimori T., Tomonaga T., Matsushita K., Oh-Ishi M., Kodera Y., Maeda T., Nomura F., Matsubara H., Shimada H., Ochiai T. (2006), "Proteomic analysis of primary esophageal squamous cell carcinoma reveals downregulation of a cell adhesion protein, periplakin", *Proteomics*. 6(3): 1011-8
- Nordlund J. J., Boissy R. E., Hearing V. J., King R., Oetting W., Ortonne J. P. et al.(2006, 2<sup>nd</sup> Edition), "The Pigmentary System: Physiology and Pathophysiology"

Oshiro R., Yamamoto H., Takahashi H., Ohtsuka M., Wu X., Nishimura J., Takemasa I., Mizushima T., Ikeda M., Sekimoto M., Matsuura N., Doki Y., Mori M. (2012), "C4.4A is associated with tumor budding and epithelial-mesenchymal transition of colorectal cancer", *Cancer Sci.* 103(6): 1155-64

Oster B., Thorsen K., Lamy P., Wojdacz T. K., Hansen L. L., Birkenkamp-Demtröder K., Sørensen K. D., Laurberg S., Orntoft T. F., Andersen C. L. (2011), "Identification and validation of highly frequent CpG island hypermethylation in colorectal adenomas and carcinomas", *Int J Cancer.* 129(12): 2855-66

Panka D. J., Atkins M. B., Mier J. W. (2006), "Targeting the mitogen-activated protein kinase pathway in the treatment of malignant melanoma", *Clin Cancer Res* 12 (7 Pt 2): 2371-2375

Park H. S., Park C. H., Choi B. R., Lim M. S., Heo S. H., Kim C. H., Kang S. G., Whang K. U., Cho M. K. (2009), "Expression of heat shock protein 105 and 70 in malignant melanoma and benign melanocytic nevi", *J Cutan Pathol.* 36(5): 511-6

Patsis C., Yiotakis I., Scorilas A. (2012), "Diagnostic and prognostic significance of human kallikrein 11 (KLK11) mRNA expression levels in patients with laryngeal cancer", *Clin Biochem.* 45(9): 623-30

Prasad M. L., Pellegata N. S., Huang Y., Nagaraja H. N., da la Chapelle A., Kloos R. T. (2005), "Galectin-3, fibronectin-1, CITED-1, HBME1 and cytokeratin-19 immunohistochemistry is useful for the differential diagnosis of thyroid tumors", *Mod Pathol* 18(1): 48-57

Qiao S., Lamore S. D., Cabello C. M., Lesson J. L., Muñoz-Rodriguez J. L., Wondrak G. T. (2012), "Thiostrepton is an inducer of oxidative and proteotoxic stress that impairs viability of human melanoma cells but not primary melanocytes", *Biochem Pharmacol.* 83(9): 1229-40

Qin X. Y., Wei F., Yoshinaga J., Yonemoto J., Tanokura M., Sone H. (2011), "siRNA-mediated knockdown of aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator 2 affects hypoxia-inducible factor-1 regulatory signaling and metabolism in human breast cancer cells", *FEBS Lett.* 585(20): 3310-5

Riker AI, Enkemann SA, Fodstad O, Liu S, Ren S, Morris C, Xi Y, Howell P, Metge B, Samant RS, Shevde L. A., Li W., Eschrich S., Daud A., Ju J., Matta J. (2008), "The gene expression profiles of primary and metastatic melanoma yields a transition point of tumor progression and metastasis", *BMC Med Genomics* 1: 13

Rothberg B. E., Moeder C. B., Kluger H., Halaban R., Elder D. E., Murphy G. F., Lazar A., Prieto V., Duncan L. M., Rimm D. L. (2008), "Nuclear to non-nuclear Pmel17/gp100 expression (HMB45 staining) as a discriminator between benign and malignant melanocytic lesions", *Mod Pathol* 21(9): 1121-9



Ryu B., Kim D. S., Deluca A. M., Alani R. M. (2007), "Comprehensive expression profiling of tumor cell lines identifies molecular signatures of melanoma progression", *PLoS One* 2(7)

Sang L., Collier H. A., Roberts J. M. (2008), "Control of the reversibility of cellular quiescence by the transcriptional repressor HES1", *Science* 321(5892): 1095-100

Sang L., Collier H. A. (2009), "Fear of commitment: Hes1 protects quiescent fibroblasts from irreversible cellular fates", *Cell Cycle* 8(14): 2161-7

Senft D., Berking C., Graf S. A., Kammerbauer C., Ruzicka T., Besch R. (2012), "Selective induction of cell death in melanoma cell lines through targeting of Mcl-1 and A1", *PLoS One*. 7(1)

Shakhova O., Zingg D., Schaefer S. M., Hari L., Civenni G., Blunsch J., Claudinot S., Okoniewski M., Beermann F., Mihic-Probst D., Moch H., Wegner M., Dummer R., Barrandon Y., Cinelli P., Sommer L. (2012), "Sox10 promotes the formation and maintenance of giant congenital naevi and melanoma" *Nat Cell Biol* 14(8): 882-90

Sun G., Qin J., Qiu Y., Gao Y., Yu Y., Deng Q., Zhong M. (2009), "Microarray analysis of gene expression in the ovarian cancer cell line HO-8910 with silencing of the ZNF217 gene", *Mol Med Report*. 2(5): 851-5

Tam E. M., Morrison C. J., Wu Y. I., Stack M. S., Overall C. M. (2004), "Membrane protease proteomics: Isotope-coded affinity tag MS identification of undescribed MT1-matrix metalloproteinase substrates", *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101(18): 6917-22

Tang L., Tron V., Reed J., Trotter M. (1998), "Expression of apoptosis regulators in cutaneous malignant melanoma", *Clin Cancer Res* 4: 1865-71

Tong M., Chan K. W., Bao J. Y., Wong K. Y., Chen J. N., Kwan P. S., Tang K. H., Fu L., Qin Y. R., Lok S., Guan X. Y., Ma S. (2012), "Rab25 is a tumor suppressor gene with anti-angiogenic and anti-invasive activities in esophageal squamous cell carcinoma", *Cancer Res*.

Villares G. J., Dobroff A. S., Wang H., Zigler M., Melnikova V. O., Huang L., Bar-Eli M. (2009), "Overexpression of protease-activated receptor-1 contributes to melanoma metastasis via regulation of connexin 43", *Cancer Res* 69(16): 6730-7

Walia V., Mu E. W., Lin J. C., Samuels Y. (2012), "Delving into somatic variation in sporadic melanoma", *Pigment Cell Melanoma Res*. 25(2): 155-70

Wang X. X., Zhu Z., Su D., Lei T., Wu X., Fan Y., Li X., Zhao J., Fu L., Dong J. T., Fu L. (2011), "Down-regulation of leucine zipper putative tumor suppressor 1 is associated with poor prognosis, increased cell motility and invasion, and epithelial-to-mesenchymal transition characteristics in human breast carcinoma", *Hum Pathol*. 42(10): 1410-9

Ward K. A., Lazovich D., Hordinsky M. K. (2012), "Germline melanoma susceptibility and prognostic genes: A review of the literature", J Am Acad Dermatol. 12

Welsch U. (2006, 2. Auflage), "Lehrbuch Histologie"

Yang K., Mooney C., Spahlinger G., Schuetze S., Arias-Pulido H., Verschraegen C., Gimotty P., Buckanovich R. J. (2012), "DR6 as a diagnostic and predictive biomarker in adult sarcoma", PLoS One 7(5)

Yang S., Meyskens F. L. Jr. (2005), "Alterations in activating protein 1 composition correlate with phenotypic differentiation changes induced by resveratrol in human melanoma", Mol Pharmacol 67(1): 298-308

Youle R. J., Strasser A. (2008), "The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death", Nat Rev Mol Cell Biol. 9(1): 47-59

Zanella F., Renner O., García B., Callejas S., Dopazo A., Peregrina S., Carnero A., Link W. (2010), "Human TRIB2 is a repressor of FOXO that contributes to the malignant phenotype of melanoma cells", Oncogene. 29(20): 2973-82

Zeng L., Li T., Xu D. C., Liu J., Cui M. Z., Fu X., Xu X. (2012), "Death Receptor 6 Induces Apoptosis Not Through Type I or Type II Pathways, but Via a Unique Mitochondria-dependent Pathway by Interacting with Bax", J Biol Chem. Jul 3<sup>rd</sup>

Zhang D., Chen C., Li Y., Fu X., Xie Y., Li Y., Huang Y. (2012), "Cx31.1 acts as a tumour suppressor in non-small cell lung cancer (NSCLC) cell lines through inhibition of cell proliferation and metastasis", J Cell Mol Med 16(5): 1047-59

## 6 Danksagung

Ich möchte mich zuoberst sehr bei meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Anja-Katrin Boßerhoff bedanken. Ich danke ihr für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und für die Möglichkeit, hier promovieren zu können. Weiterhin danke ich für die engagierte Betreuung, die Geduld und die stets konstruktiv kritischen Anregungen, ohne die ein Gelingen dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein Dank gilt ebenfalls Herrn Prof. Dr. Ferdinand Hofstädter, dafür dass ich meine Dissertation an seinem Institut anfertigen konnte.

Besonders bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, für das gute Arbeitsklima und für die tolle Unterstützung meiner Arbeit. Hier möchte ich speziell meine Laborbetreuerin Simone hervorheben, die mir die technischen Arbeitsschritte geduldig und detailliert nahegebracht hat.

Zusätzlich möchte ich mich bei meinen Mitstreitern Sonja und Susi bedanken, mit denen ich immer Fragestellungen (und andere Sachen) diskutieren konnte, und durch deren Engagement ein förderliches Zusammengehörigkeitsgefühl entstanden ist.

Zu guter Letzt möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern bedanken, denen ich alles zu verdanken habe und die mir auch mein Studium ermöglicht haben. Sie haben mich immer vorbehaltlos, liebevoll und vielseitig unterstützt. Auch ohne sie wäre diese Arbeit so nicht möglich gewesen.

## Erklärung zum Promotionsverfahren

nach § 3 Abs. 3 und 4 der Promotionsordnung  
der Fakultät für Medizin der Universität Regensburg

Name: \_\_\_\_\_

Vorname: \_\_\_\_\_

geb. am: \_\_\_\_\_

in: \_\_\_\_\_

Ich erkläre,

- dass ich den **Doktorgrad der Medizin** nicht schon an einer Hochschule der Bundesrepublik Deutschland erworben habe
- dass ich nicht an anderer Stelle zu einem Promotionsverfahren zum Erwerb des **medizinischen Doktorgrades** zugelassen bin
- dass ich die **medizinische Doktorprüfung** nicht schon an einer Hochschule der Bundesrepublik Deutschland endgültig bestanden habe

Außerdem erkläre ich,

- dass mir keine Tatsachen bekannt sind, die mich zur Führung eines akademischen Grades im Sinne des Gesetzes über die Führung akademischer Grade unwürdig erscheinen lassen
- dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

\_\_\_\_\_  
(Ort, Datum)

\_\_\_\_\_  
(Unterschrift)

Die einmalige Rücknahme des Promotionsgesuches ist bis zur Bestellung der Gutachter zulässig.